



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

액상 조미소재화를 위한
갈색거저리 유충 발효 및 효소
분해물의 특성 연구

A Study on Characteristics of Fermented and
Hydrolysed *Tenebrio molitor* Larvae for
Liquefied Flavoring Material Application

2017년 2월

서울대학교 대학원

식품영양학과

이 지 원

국문초록

본 연구는 갈색거저리 유충을 주재료로 하여 황국균 및 단백분해효소를 첨가하고 처리 시간과 방법을 달리하여 제조한 분해물의 특성 변화를 알아봄으로써 식용곤충을 활용한 액상 조미소재 개발의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

황국균(*Aspergillus oryzae*)을 이용하여 protease 역가가 높은 갈색거저리 코지를 제조(황국균 1% 농도, 48시간 배양)한 후 소금물 담금 처리를 달리하여 90일 동안 숙성시키며 발효액의 변화 양상을 관찰한 결과, 갈색거저리 열풍건조분 함량이 많은 저염 농도의 LX군에서 protease 활성도의 증가로 총 질소 및 아미노질소 함량이 숙성 기간 중 가장 높았다($p<0.05$). 90일 동안 숙성한 LX는 유리 아미노산 중 glutamic acid가 15.16%를 차지하였으며, 7점 척도의 관능검사 결과 단맛 (3.53점), 구수한맛 (4.30점), 전체기호도 (4.90점)에서 모두 높은 점수를 얻었다($p<0.05$). 쌀가루를 첨가한 O군에서는 숙성함에 따라 amylase 활성도가 높아져 총 당 및 환원당이 증가하였으나, 관능적 측면에서 쌀가루 첨가 유무보다는 소금 농도가 낮은 L군에서 더 좋은 효과를 나타냈다($p<0.05$). 모든 실험군에서 산도는 1% 미만이며 대장균군은 불검출로 나타나 식용하기에 어려움이 없었던 것으로 보이며, 그 중 LX는 관능 기호도가 우수했던 것과 함께 아미노산과 환원당 간의 메일라드 반응을 통한 갈색도 증가와 향의 강도 증가를 보였다.

Alcalase(A)와 황국균 유래 단백분해효소인 Flavourzyme(F)의 단독 처리 혹은 복합 처리는 가수분해 양상에 영향을 주었다. 효소 처리군은 대조군보다 모두 수율이 높았으며, 효소 처리군의 가수분해도는 F군과 AF군이 높았고 AF군은 시간에 증가함에 따라 가수분해도가 크게 증가했다. SEC 결과, 효소 처리군에서는 고분자의 단백질이 저분자의 펩타이드로 분해됨을 확인하였고 AF에서 peak4-peak7의 면적 값이 가장 높게 나타났다. 실험군의 수율을 고려한 총 항산화활성은 DPPH 자유 라디칼 소거능, ABTS 자유 라디칼 소거능($p<0.05$), FRAP 활성능($p<0.05$)에 있

어 C가 가장 낮았고 A군>AF군>F군 순서로 높았다.

관능 평가 결과, 맛의 강도가 낮은 대조군(C)과 맛의 강도가 높은 F군에서 기호도가 모두 높게 나타나 Flavourzyme에 의해 특정한 맛이 느껴지는 것이 선호됨을 알 수 있었고(관능 평가 기호도 결과: F2>C>AF2>A2), 유리 아미노산과 기호도 간의 상관관계 분석 결과 감칠맛을 내는 Glu, Gln과 단맛을 내는 것으로 알려진 Pro에서 유의한 정적 상관관계를, 유황맛(sulfurous taste)을 내는 것으로 알려진 Met에서 유의성은 없었으나 음의 상관관계를 나타내 조미소재 활용에 있어 F2가 좋은 소재임을 확인하였다. 그러나 관능 기호도는 모두 4점(보통이다) 이하로 나타나 향산화능을 고려한다면 A2, AF2 또한 기능성 조미소재가 될 수 있으며, 가수분해물의 활용성을 높이기 위해서는 부재료의 첨가를 통한 관능적 측면의 보완 등이 필요할 것으로 판단된다.

주요어 : 갈색거저리 유충, 발효 특성, 단백질분해효소, 가수분해, 향산화 활성, 관능 특성

학 번 : 2015-21708

목 차

국문초록	i
목 차	iii
표 목차	vii
그림 목차	ix
I. 서론	1
II. 본론	3
1. 황국균을 이용한 갈색거저리 발효액의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색	
1.1. 실험 재료 및 전처리	3
1.1.1. 실험재료	3
1.1.2. 코지 제조 조건 확립	4
1.1.3. 소금물 담금 방법	5
1.2. 실험 방법	6
1.2.1. 기간에 따른 특성 변화	6
1.2.1.1. 염도	6
1.2.1.2. 일반세균수 및 대장균군 검사	6
1.2.1.3. pH 및 총산도	7
1.2.1.4. 색도 및 갈색도	7
1.2.2. 단백질과 탄수화물의 분해 양상	9

1.2.2.1. 총 질소 함량	9
1.2.2.2. 아미노태 질소 함량	10
1.2.2.3. protease 효소활성도	11
1.2.2.4. 총 당 함량	12
1.2.2.5. 환원당 함량	12
1.2.2.6. amylase 효소활성도	13
1.2.3. 관능적 특성 및 유리 아미노산 분석	14
1.2.3.1. 관능적 특성 평가	14
1.2.3.2. 유리 아미노산 분석	15
1.2.4. 통계 처리	16

2. 단백분해효소를 이용한 갈색거저리 가수분해물의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

2.1. 실험 재료 및 전처리	17
2.1.1. 실험재료	17
2.1.2. 탈지분 제조	17
2.1.3. 가수분해물 제조	18
2.2. 실험 방법	20
2.2.1. 가수분해물의 수율	20
2.2.2 가수분해 양상 분석	21
2.2.2.1 가수분해도	21
2.2.2.2 Size Exclusion Chromatography 분석	22
2.2.2.3 SDS-PAGE에 의한 분자량 확인	25
2.2.3. 항산화 활성 측정	26
2.2.3.1. DPPH 자유 라디칼 소거 활성능	26
2.2.3.2. ABTS 자유 라디칼 소거 활성능	26
2.2.3.3. FRAP 활성 측정	27

2.2.4. 관능적 특성 및 유리 아미노산 분석	28
2.2.4.1. 관능적 특성 평가	28
2.2.4.2. 유리 아미노산 분석	29
2.2.4.3. 아미노산 조성과 기호도 간의 상관관계	29
2.2.5. 통계 처리	29

III. 실험결과 및 고찰 30

1. 황국균을 이용한 갈색거저리 발효액의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

1.1 코지의 protease 활성도	30
1.2 기간에 따른 특성 변화	32
1.2.1. 염도	32
1.2.2. 일반세균수 및 대장균군	34
1.2.3. pH 및 총산도	36
1.2.4. 색도 및 갈색도	38
1.3 단백질과 탄수화물의 분해 양상	41
1.3.1. 총 질소 함량	41
1.3.2. 아미노태 질소 함량	43
1.3.3. protease 효소활성도	45
1.3.4. 총 당 함량	47
1.3.5. 환원당 함량	49
1.3.6. amylase 효소활성도	51
1.4. 관능적 특성 및 유리 아미노산 조성	53
1.4.1. 관능적 특성 결과	53
1.4.2. 유리 아미노산 조성	56

2. 단백분해효소를 이용한 갈색거저리 가수분해물의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

2.1 가수분해물의 수율	61
2.2. 가수분해도	63
2.3. Size Exclusion Chromatography 분석	66
2.4. SDS-PAGE에 의한 분자량 확인	70
2.5. DPPH, ABTS 자유 라디칼 소거 활성능 및 FRAP 활성	72
2.6. 관능적 특성 및 아미노산 조성 비교	75
2.6.1. 관능적 특성 평가	75
2.6.2. 유리 아미노산 조성 분석과 기호도 간의 상관관계	77

IV. 요약 및 결론 81

참고문헌 83

Abstract 98

표 목차

Table 1-1. Mixing condition for <i>Tenebrio molitor</i> fermented liquids.....	5
--	---

Table 1-2. Operating condition of HPLC for free amino acids analysis.....	15
---	----

Table 2-1. Preparation of <i>Tenebrio molitor</i> hydrolysates	19
---	----

Table 1-3. Changes in total aerobic plate of <i>Tenebrio molitor</i> fermented liquids.....	35
---	----

Table 1-4. Changes in Hunter color value of <i>Tenebrio molitor</i> fermented liquids.....	39
--	----

Table 1-5. Sensory evaluation of <i>Tenebrio molitor</i> fermented liquids.....	55
---	----

Table 1-6. Free amino acids of <i>Tenebrio molitor</i> fermented liquids.....	58
---	----

Table 2-2. Comparison area(%) and area(mV*sec) of <i>Tenebrio molitor</i> hydrolysates by size exclusion chromatography	69
--	----

Table 2-3. DPPH, ABTS, FRAP antioxidant capacities of <i>Tenebrio molitor</i> hydrolysates	74
--	----

Table 2-4. Sensory evaluation of <i>Tenebrio molitor</i> hydrolysates	76
---	----

Table 2-5. Free amino acids analysis and Pearson correlation coefficients with overall acceptance scores of <i>Tenebrio molitor</i> hydrolysates.....	79
---	----

그림 목차

Fig. 2-1. Chromatogram of PEO(poly ethylene oxide)/PEG(poly ethylene glycol) standard23

Fig. 2-2. Calibration data of PEO(poly ethylene oxide)/PEG(poly ethylene glycol) standard24

Fig. 1-1. Protease activity of *Tenebrio molitor* koji
.....31

Fig. 1-2. Changes in salinity of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....33

Fig. 1-3. Changes in pH and total acidity of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....37

Fig. 1-4. Changes in browning index of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....40

Fig. 1-5. Changes in total nitrogen content of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....42

Fig. 1-6. Changes in amino nitrogen content of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....44

Fig. 1-7. Changes in protease activity of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....46

Fig. 1-8. Changes in total sugar content of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....48

Fig. 1-9. Changes in reducing sugar content of *Tenebrio molitor* fermented liquids50

Fig. 1-10. Changes in amylase activity of *Tenebrio molitor* fermented liquids.....52

Fig. 2-3. Yield of *Tenebrio molitor* hydrolysates
.....62

Fig. 2-4. Degree of hydrolysis of *Tenebrio molitor* hydrolysates
.....65

Fig. 2-5. Chromatogram of *Tenebrio molitor* hydrolysates by size exclusion chromatography.....68

Fig. 2-6. SDS-PAGE of *Tenebrio molitor* hydrolysates
.....71

I. 서론

갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 2016년 1월 식약처에서 일반식품원료로 승인됨에 따라 식품 소재화를 위한 연구의 필요성이 증대되었다. 기존 연구에는 갈색거저리의 자가규격 및 식품원료로의 안전성을 확보하기 위해 영양성분과 유해물질 분석(Yoo JM 등 2013), 분말 전처리 조건의 확립(Chung MY 등 2013), 동결건조처리 자가규격 및 유통기한 설정(Chung MY 등 2014), 가공 조건에 따른 냉장 저장 중의 산화 안정성 평가(Kim SY 등 2015)가 있으나 갈색거저리를 주재료로 한 새로운 가공 적용성의 검토 및 조미소재 개발에 대한 연구는 미비하다.

갈색거저리는 고단백 급원으로(Ng WK 등 2001), 단백질은 protease에 의해 분해됨에 따라 펩타이드와 아미노산을 생성한다. 단백질 분해 조건에 따라 펩타이드와 유리 아미노산의 함량 및 조성은 달라지는데, dipeptide, tripeptide, hydrophobic peptide 등의 bioactive peptide는 항산화 활성을 증가시키며(Wu HC 등 2003) 특정 아미노산들은 antioxidant로 분류되기도 한다(Marcuse 1962). 또한 펩타이드와 아미노산은 맛에도 영향을 주어 단백질의 분해산물을 이용한 기능성 조미소재 개발 시도는 다양하게 수행되고 있다(Su 등 2012, Mccarthy AL 등 2012).

탈지대두를 사용한 효소분해간장과 같은 효소를 통한 발효 숙성 처리는 화학적 방법보다 유해성이 낮으며 반응 과정을 쉽게 통제할 수 있고(Chae HJ 등 1997, Mannheim과 Cheryan 1992), 최근 천연 가공 방식에 의한 조미료의 개발이 각광받음에 따라 자연적인 조건에서 단백질을 효과적으로 분해할 수 있다는 이점이 있다. 개량식 간장을 만드는 데 사용되는 황국균(*Aspergillus oryzae*)은 단백질 분해능이 매우 강하며 맛을 향상시키는 아미노산을 생성하는 능력이 뛰어나 우리의 전통식품인 된장, 간장, 고추장 코지 제조에 광범위하게 사용되고 있다(Kim YM 등 1990). 따라서 본 연구는 갈색거저리 유충을 원료로 하여 황국균으로 코지를 만들고 이를 장기 숙성한 천연 조미료를 개발하기 위해 적합한 발효액 조건을 확립하고자 한다.

또한, 황국균에서 유래한 단백질분해효소인 Flavourzyme은 상업용 효

소로서 exo-peptidase를 함유하여 쓴맛을 감소시킴에 따라 풍미를 증진시킨다(Seo WH 등 2008). 이와 함께 endo-peptidase형인 Alcalase는 향산화 활성 및 ACE 저해능 등의 기능성이 보고된 바 있으며(Jamdard SN 등 2010), Flavourzyme과 Alcalase는 효소의 최적 활성 온도와 pH의 조건이 유사하여 두 효소를 복합처리 하여 향산화 활성 및 관능적 특성을 분석한 연구가 수행된 바 있다(Yarnpakdee 등 2015). 효소의 종류에 따라 향산화 활성(Kong과 Xiong 2006)과 맛(Liu BY 등 2016)이 크게 달라질 수 있으므로 효소 처리 조건을 달리하여 조미소재 개발을 시도했던 연구는 다수 있으나(Oh JH 등 2002, Noh KH 등 2012, Bagnasco 등 2013) 갈색거저리를 기질로 사용한 연구는 아직 수행된 바 없다. 따라서 갈색거저리 유충이라는 새로운 기질에 Alcalase와 Flavourzyme을 단독 혹은 복합 처리함으로써 단백질 분해산물의 생성 패턴을 파악하고 향산화 활성과 관능적 특성을 파악하여 천연 조미료를 개발하기 위해 적합한 가수분해 조건을 확립하고자 한다.

결과적으로, 본 연구는 갈색거저리 유충을 주재료로 황국균과 단백질분해효소의 2가지 방식을 사용하여 갈색거저리 유충 분해물을 제조하고, 시간(기간)에 따른 분해물의 특성 변화와 소비자 기호도 검사를 통한 적합한 조건을 파악함으로써 식용곤충 기반의 액상 조미소재를 개발하는데에 의의가 있다.

II. 본론

1. 황국균을 이용한 갈색거저리 발효액의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

1.1. 실험 재료 및 전처리

1.1.1. 실험 재료

경기도 화성시에 위치한 농가로부터 구입한 갈색거저리 유충을 -80°C 에서 24시간 동안 희생시켰으며, 물로 세척한 후 갈색거저리 코지를 제조하는 데 사용하였다. 코지를 제조하기 위해 사용한 황국균은 조제종국으로 수원발효식품연구소에서 구입하였으며, 소금물 담금 과정에는 볶음쌀가루(맑은들), 천일염(청정원), 미생물 유입을 막는 Dialysis membrane(Spectra/Por 3 Dialysis Membrane, USA)을 사용하였다.

1.1.2. 코지 제조 조건 확립

갈색거저리 코지를 제조하기 위해 우선 열풍건조분말을 제조하였다. 물기를 제거한 갈색거저리 유충을 가로 9 cm, 세로 9 cm, 높이 15 cm의 유리 용기에 담고 121℃에서 30분 동안 고압증기멸균처리 하였으며, 이후 열풍건조기(LD-918BH, L' equip, Korea)로 70℃에서 24시간 동안 건조 후 분쇄기(HR-2860, Philips, Korea)로 분쇄하였다.

다음으로 황국균의 첨가 농도 및 시간을 달리하여 갈색거저리 코지를 제조하기 위해 150 × 20 mm의 petri dish에 열풍건조분말 50 g을 깔고 0.5, 1, 1.5%(w/w)의 황국균을 첨가하였으며 3차 증류수 41 mL를 넣어 수분 함량을 약 45%로 조정하였다. 이후 통풍배양기에 넣어 30℃의 조건에서 24, 36, 48, 60, 72시간 동안 배양하였고 일정한 습도 유지를 위해 배양기 내부에 물통을 두었다. 배양 시간이 끝난 해당 코지는 동결건조하여 분쇄기(HR-2860, Philips, Korea)로 분쇄하였다. Protease 역가가 가장 높은 코지 제조 조건 확립을 위해 protease 활성도를 측정하여 이를 바탕으로 소금물 담금 조건을 달리한 갈색거저리 발효액을 제조하였다.

1.1.3. 소금물 담금 방법

소금물 농도와 쌀가루 첨가 유무를 달리하여 90일 동안 숙성하였다. 0.9 L 발효용 유리용기(Lock&Lock, Korea)에 갈색거저리 코지, 갈색거저리 열풍건조분, 볶음쌀가루, 천일염, 물을 배합하였다(Table 1-1).

Table 1-1. Mixing condition for *Tenebrio molitor* fermented liquids

Salt concentration		High		Low	
Rice flour addition		O	X	O	X
Type		HO	HX	LO	LX
Ingredients	<i>T.molitor</i> koji(g)	24	24	24	24
	<i>T.molitor</i> hot-air dried powder(g)	24	48	24	48
	Rice flour(g)	24	-	24	-
	Salt(g)	129.6	129.6	64.8	64.8
	Water(mL)	504	504	504	504

이를 20℃에서 저장하면서 0, 30, 60, 90일에 채취하였고 3,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후 여과지(Whatman No.1)로 여과한 여액을 -80℃에 보관하며 분석을 실시하였다.

1.2. 실험 방법

1.2.1. 기간에 따른 특성 변화

1.2.1.1. 염도

염도 함량은 Mohr법(Hamilton LF 등 1964)으로 분석하였다. 시료 450 μ L를 증류수 40 mL로 희석한 후 이 중 10 mL를 취하였다. 이에 2% $K_2Cr_2O_4$ 지시약 1 mL을 가하여 혼합하고 0.1 N $AgNO_3$ 용액으로 적갈색이 될 때까지 적정하여 염도 함량을 구하였다.

$$NaCl \text{ 함량}(\%) = 0.00585 \times V \times F \times D \times 100 / S$$

V : 0.1 N $AgNO_3$ 용액의 적정소비량(mL)

F : 0.1 N $AgNO_3$ 용액의 역가

D : 희석배수

S : 시료채취량(mL)

0.00585 : 0.1 N $AgNO_3$ 용액 1 mL에 해당하는 NaCl의 양

1.2.1.2. 일반세균수 및 대장균군 검사

일반세균수 측정은 식품공전(KFDA, 2016)에 따라 실시하며 3회 반복 측정하였다. 0일, 30일, 60일, 90일마다 시료 1 mL를 바로 취하여 실험에 사용하였다. 시료 1 mL와 0.9% 멸균생리식염수 9 mL로 연속 희석하여 희석액 1 mL를 건조필름배지(Petri filmTM aerobic count plate, 3MTM, St. Paul, MN, USA)에 접종하고 35 \pm 1 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 계산하여 평균 집락수에 희석배수를 곱한 것을 일반세균수(log CFU/mL)로 하였다.

대장균군 검출 시험은 식품공전(KFDA, 2016)에 따라 실시하며 3회 반복 측정하였으며, 0일, 30일, 60일, 90일마다 시료 1 mL를 바로 취하여 0.9% 멸균생리식염수 9 mL로 1회 희석한 것을 사용하였다. 희석액 1 mL를 건조필름배지(Petri film™ E. coli/Coliform count plate, 3M™, St. Paul, MN, USA)에 접종하고 35±1℃에서 48시간 동안 배양한 후 생성된 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성한 집락수를 계산하여 평균 집락수에 희석배수를 곱한 것을 대장균군 수로 산출하였다.

1.2.1.3. pH 및 총 산도

시료의 pH는 pH meter(S20 SevenEasy™ pH meter, Mettler Toledo Inc., USA)를 이용하여 원액 그대로 측정하였으며, 시료의 총 산도는 10 mL를 채취하여 pH 8.30이 될 때까지 적정에 소비되는 0.1 N NaOH 용액의 소비량을 측정하여 다음과 같은 식으로 적정산도 값을 구하였다.

$$\text{Total acidity (\% lactic acid, w/v)} = (0.009008 \times V \times F \times 10) \times 100 / S$$

V : 0.1 N NaOH 용액의 적정 소비량(mL)

F : 0.1 N NaOH 용액의 역가

S : 시료 채취량(mL)

0.009008 : 0.1 N NaOH 용액 1 mL에 해당하는 젖산의 함량

1.2.1.4. 색도 및 갈색도

색도는 시료를 quartz cell에 담아 색차계(CM-5, Minolta, Japan)를 이용하여 liquid mode에서 Hunter's color value의 L(lightness),

a(redness), b(yellowness) 값으로 나타냈으며, 5회 반복 측정하였다. 갈색도는 시료 2 mL를 3차 증류수 3 mL로 희석하여 분광광도계(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1.2.2. 단백질과 탄수화물의 분해 양상

1.2.2.1. 총 질소 함량

총 질소 함량은 Kjeldahl 질소정량법(AOAC, 1990)을 이용하여 측정하였다. 먼저 분해 과정을 위해 시료 1 mL를 Kjeldahl 플라스크에 넣은 다음, 분해 촉매제(Kjeltabs Se, FOSS, Korea) 2개와 진한 황산 12 mL를 가하여 혼합하고 420℃로 설정된 분해 장치(Tecator Digester, FOSS, Korea)에서 2시간 동안 반응시켰다. 분해가 완료되면 30분간 냉각하여 Auto Kjeldahl System(Kjeltec 1026, FOSS, Korea)에서 증류 및 중화한 후 0.1 N HCl 표준용액으로 적정하였다. 같은 방법으로 시료를 제외한 공시험을 병행하였으며 다음과 같은 식으로 총 질소 함량을 구하였다.

$$\text{총 질소 (\%)} = (A-B) \times M \times 14.01 \times F \times 100 / S$$

A : 시료의 0.1 N HCl 용액의 적정소비량(mL)

B : Blank test의 0.1 N HCl 용액의 적정소비량(mL)

M : HCl의 몰농도

F : 0.1 N HCl 용액의 역가

S : 시료의 채취량(μL)

14.01 : 질소의 원자량

1.2.2.2. 아미노태 질소 함량

아미노태 질소 함량은 Formol 적정법에 의해 분석하였으며, 시료 0.4 mL를 25 mL로 정용하고 이 중 20 mL를 채취하여 시험용액으로 하였다. 시험용액 20 mL에 0.5% 페놀프탈레인 지시약 500 μ L를 가하고 0.1 N NaOH 용액으로 담홍색이 될 때까지 중화하였다. 이에 중성 포르말린 용액 5 mL를 가하여 유리된 산을 0.1 N NaOH 용액으로 담홍색이 될 때까지 적정하여 시료 20 mL를 중화하는 데 필요한 0.1 N NaOH의 mL 수를 구하였다. 공시험은 3차 증류수 20 mL를 사용하여 동일한 조작으로 시행하였으며 다음과 같은 공식으로 아미노태 질소 함량을 산출하였다.

$$\text{아미노태 질소 함량 (mg\%)} = (A-B) \times 1.4 \times F \times D \times 100 / S$$

A : 회석 시료 20 mL를 중화하는 데 소요된 0.1 N NaOH 용액의 적정 소비량(mL)

B : 공시험에서 소요된 0.1 N NaOH 용액의 적정소비량(mL)

F : 0.1 N NaOH 용액의 역가

D : 회석배수

S : 시료채취량(mL)

1.2.2.3. protease 활성도

protease 활성도는 프로테아제 시험방법(KFDA, 2016)을 이용하여 측정하였으며, 시료 1 mL를 3차 증류수로 10배 희석한 것을 시험용액으로 하였다.

우선, 0.6% 카제인용액(casein powder AR, England) 1 mL를 시험관에 넣고 37℃의 항온수조에 가온한 다음 시험용액 1 mL를 넣어 항온수조에서 정확히 10분 간 방치하였다. 이에 0.4 M TCA(Sigma Chemical Co. USA) 2 mL를 넣고 다시 37℃에서 25분 간 방치한 후 여과하였다. 여액 1 mL를 시험관에 정확히 취하여 0.4 M Na₂CO₃(Sigma Chemical Co. USA) 5 mL와 3배 희석한 Folin-Ciocalteu phenol reagent(Sigma Chemical Co. USA) 1 mL를 넣어 37℃에서 20분 간 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea).

공시험용액은 시험용액 1 mL를 시험관에 넣고 37℃의 항온수조에서 가온한 다음 0.4 M TCA 2 mL를 섞은 후 0.6% 카제인용액 1 mL를 넣어 37℃에서 25분 간 방치한 후 이를 여과하여 위와 동일한 조작으로 흡광도를 측정하였다.

표준물질은 L-tyrosine(Sigma Chemical Co. USA)을 사용하였고, 프로테아제의 역가(Unit/mL)는 검체 1 mL가 함유하는 역가로 1분 간 효소가 반응하여 생성되는 L-tyrosine의 양을 μ g수로 환산하여 계산하였다.

1.2.2.4. 총 당 함량

총 당 함량은 phenol-sulfuric acid 방법(Dubios M 등 1956)을 이용하여 측정하였다. 시료를 10-50배로 희석하여 사용하였으며, 표준물질은 glucose(Sigma Chemical Co. USA)를 사용하였다. 시험용액 1 mL에 95% 황산(Sigma Chemical Co. USA) 5 mL와 5%(v/v) phenol(Sigma Chemical Co. USA)용액 1 mL를 가하여 섞고 충분히 발열시켰으며, 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea) 총 당 함량을 구하였다.

1.2.2.5. 환원당 함량

환원당은 Dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 비색법(Miller GL 1959)을 일부 변형한 방법으로 측정하였다. 시료를 10-50배로 희석하여 사용하였으며, 표준물질은 glucose(Sigma Chemical Co. USA)를 사용하였다. 시험용액 1 mL에 DNS reagent 1 mL를 혼합한 것을 90℃에서 15분 동안 반응시켰다. 10분 동안 실온에 방냉한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea) 환원당 함량을 구하였다.

1.2.2.6. amylase 활성도

amylase 활성도는 α -amylase 시험방법(KFDA, 2016)을 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL를 3차 증류수로 1-3배 희석한 것을 시험용액으로 하였다. 우선, 1% 가용성 전분(Sigma Chemical Co. USA)용액 5 mL, 맥바인(McIlvaine) 완충액(pH 7.0) 13 mL와 0.1% 염화칼슘(Shinyo Pure Chemicals)용액 1 mL를 시험관에 넣고 37°C의 항온수조에 가온한 후 시험용액 1 mL를 넣어 정확히 20분 간 방치하였다. 이후 100°C에서 10분 간 가열하고 실온에서 냉각한 뒤 이를 여과하였다. 여액 0.3 mL에 DNS reagent 0.9 mL를 넣어 90°C에서 15분 간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea).

공시험용액은 시험용액 1 mL를 시험관에 넣고 100°C에서 10분 간 가열하여 활성을 잃게 한 후, 위와 동일한 조작으로 흡광도를 측정하였다.

표준물질은 glucose(Sigma Chemical Co. USA)를 사용하였고, α -amylase의 역가(Unit/mL)는 검체 1 mL가 함유하는 역가로 1분 간 효소가 반응하여 생성되는 glucose의 양을 μ g수로 환산하여 계산하였다.

1.2.3. 관능적 특성 및 유리 아미노산 분석

1.2.3.1. 관능적 특성 평가

관능적 특성을 알아보기 위해 서울대학교 식품영양학과 구성원 중 단백질 급원에 알레르기 및 거부감이 없는 비숙련 패널 40명을 선정하여 실험의 목적과 검사 방법 등을 설명한 뒤 실험에 응하도록 하였다.

시료는 90일 까지 숙성시킨 HO, HX, LO, LX의 4가지 발효액을 100℃의 끓는 물에서 30분 간 가열한 후 원심분리 및 여과하여 준비하였다. 각각의 시료마다 시료 50 mL를 쌀밥 410 g에 버무린 후 개인 당 10 g 씩 종이컵에 제공받도록 하였다.

4가지 시료의 향, 맛(짠맛, 단맛, 구수한맛), 이미 혹은 이취에 대한 강도를 7점 척도로 나타내며 이와 함께 전체적인 기호도를 7점 척도로 평가하도록 하였다. 7점 척도는 강도가 약하거나 기호도가 낮을수록 1점에 가깝도록, 강도가 크거나 기호도가 높을수록 7점에 가깝도록 표시하게 하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7의 점수 중 해당 칸에 표시하도록 하였다. 또한 이전 시료가 다음 시료에 영향을 주지 않도록 각 시료 검사 후에 물로 입을 충분히 헹군 후 일정 시간 이후에 평가하도록 하였고, 본 연구는 서울대학교 생명윤리심의위원회(SNUIRB)에서 2016년 10월 24일에 승인 후 수행되었다(승인 번호: SNUIRB No. 1610/003-006).

1.2.3.2. 유리 아미노산 분석

미량냉장원심분리기로 시료를 17,000 rpm에서 2분 동안 원심분리한 후, 상층액을 0.2 μm PTFE syringe filter로 여과하여 아미노산 분석용 시료로 하였다. 분석 시료와 아미노산 표준품은 borate buffer, Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride(FMOC), o-phthaldialdehyde/2-mercaptopropionic acid(OPA.3-MPA) 시약과 혼합하여 유도체화 한 뒤, HPLC에 주입하였으며, 분석조건은 Table 1-2와 같다.

Table 1-2. Operating condition of HPLC for free amino acids analysis

Instrument parameter	Conditions	
Model	Ultimate 3000 (Thermo dionex, USA)	
Detector	1. UV detector: 338 nm 2. FL detector (1260FLD, Agilent, USA) Excitation: 340 nm, Emission: 450 nm (OPA) Excitation: 266 nm, Emission: 305 nm (FMOC)	
Column	VDSpher 100 C18-E (4.6mm \times 150mm, 3.5 μm /VDS optilab, Germany)	
Mobile phase	A: 40 mM Sodium phosphate dibasic, pH 7 B: water/Acetonitrile/Methanol (10:45:45 v/v%)	
Gradient	Time (min)	% B
	0	5
	3.0	5
	24.0	55
	25.0	90
	31.0	90
	34.5	5
	35.0	5
Flow rate	1.5 mL/min	
Injection volume	0.5 μL	
Temperature	Column: 40 $^{\circ}\text{C}$ Sample: 20 $^{\circ}\text{C}$	

1.2.4. 통계 처리

본 연구의 모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, IBM SPSS Statistics(Ver. 21.0) 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 나타내었다. 갈색거저리 발효액의 처리 조건 및 저장기간에 따른 실험 항목의 차이를 검정하기 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며, Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 동일 집단군을 구분하였다.

2. 단백질해효소를 이용한 갈색거저리 가수분해물의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

2.1. 실험 재료 및 전처리

2.1.1. 실험 재료

본 실험에 사용된 동결건조 형태의 갈색거저리 유충은 예천곤충나라 영농조합법인으로부터 구입하였다.

2.1.2. 탈지분 제조

동결건조 형태의 갈색거저리 유충을 분쇄한 후 850 μm 이하의 균일한 갈색거저리 동결건조분말을 준비하였다. 준비된 동결건조분말과 n-hexane(96.0%, Special grade, Samchun, Korea)을 1:5(w/v) 비율로 섞어 3시간 동안 상온에서 진탕 후, 원심분리하여 여과지(Whatman No.1)로 상층액을 제거하였으며 이 과정을 2회 반복하였다. 침전물의 잔여 n-hexane을 후드에서 제거하여 준비한 최종 갈색거저리 탈지분은 69.8%의 조단백 함량을 함유하였다(data not shown).

2.1.3. 가수분해물 제조

갈색거저리 가수분해물을 제조하는 데 사용된 단백분해효소는 Alcalase(Alcalase 2.4L Food Grade, Novozymes, Denmark), Flavourzyme(Flavourzyme 1000L Food Grade, Novozymes, Denmark)이며, 효소 처리 방법과 시간을 달리하여 제조하였다.

효소를 첨가하지 않은 C(Control), Alcalase를 단독 첨가한 A, Flavourzyme을 단독 첨가한 F, Alcalase와 Flavourzyme을 단계적으로 복합 첨가한 AF로 나누었으며 시간에 따라 제조한 최종 갈색거저리 가수분해물의 제조 조건은 Table 2-1과 같다.

Table 2-1. Preparation of *Tenebrio molitor* hydrolysates

Type	Protease processing	Time(hours)
C(Control)	–	1
A1	Alcalase	1
A2	Alcalase	2
A4	Alcalase	4
A8	Alcalase	8
F1	Flavourzyme	1
F2	Flavourzyme	2
F4	Flavourzyme	4
F8	Flavourzyme	8
* AF1	Alcalase Flavourzyme	1
AF2	Alcalase Flavourzyme	2
AF4	Alcalase Flavourzyme	4
AF8	Alcalase Flavourzyme	8

*AF) pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for the remainder of the hours

탈지분 대비 효소처리농도는 1%(v/w), 탈지분 대비 3차 증류수의 배합비는 1:20(w/v), 온도는 55℃, pH 6.5-7.5, 속도 120 rpm의 동일한 조건으로 진탕하여 각각 제조하였으며 해당 시간 처리 후 95℃에서 10분 동안 불활성화하였다. AF의 경우 Alcalase와 Flavourzyme 처리 각각에 대하여 불활성화 과정을 거쳤다. 이후 3,000 rpm으로 원심분리 하여 상층액만을 여과한(Whatman No. 1) 여과액을 동결건조 하였고 -80℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 가수분해물의 수율

효소 처리 방법 및 시간 조건에 따라 각각의 가수분해물을 제조하고 원심분리를 거쳐 상층액만을 여과하고(Whatman No. 1) 동결건조한 후 무게를 측정하여 수율을 구하였다.

$$\text{수율 (\%)} = \frac{\text{해당 가수분해물의 동결건조 후 무게(g)}}{\text{해당 가수분해물에 사용된 탈지분 무게(g)}} \times 100$$

2.2.2. 가수분해 양상 분석

2.2.2.1 가수분해도

가수분해도(DH, degree of hydrolysis)는 단백질로부터 해리된 유리 아미노기의 비율을 구하기 위해 총 질소 함량(total nitrogen: TN) 대비 α -amino nitrogen(AN) 함량을 산출하여 나타냈다(You L 등 2009).

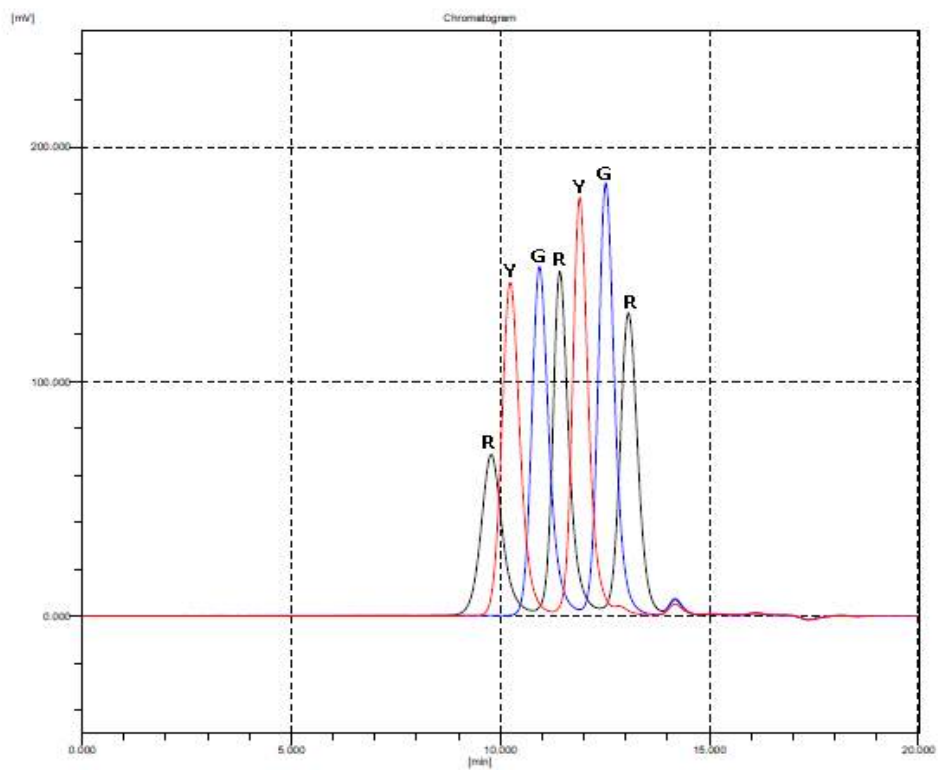
TN은 시료 0.1 g을 Kjeldahl 플라스크에 넣어 ‘1.2.2.1. 총 질소 함량’에 기술한 내용과 같이 측정하여 총 질소 함량을 계산하였다.

AN은 formol 적정법을 변형하여(Nilsang S 등 2005) 측정하였다. 가수분해물 동결건조분 0.1 g을 10 mL로 희석하여 0.1 N NaOH를 이용해 pH 7.0으로 조정 후 38% formaldehyde solution을 10 mL 첨가하여 충분히 섞었다. 이후 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여 시료 10 mL를 중화하는 데 필요한 0.1 N NaOH의 mL수를 구하였고 ‘1.2.2.2. 아미노태 질소 함량’에 기술한 내용과 같이 아미노태 질소 함량을 계산하였다. 이를 바탕으로 아래의 공식에 대입하여 가수분해도(%)를 나타내었다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \alpha\text{-amino nitrogen(AN)} / \text{total nitrogen(TN)} \times 100$$

2.2.2.2 Size Exclusion Chromatography 분석

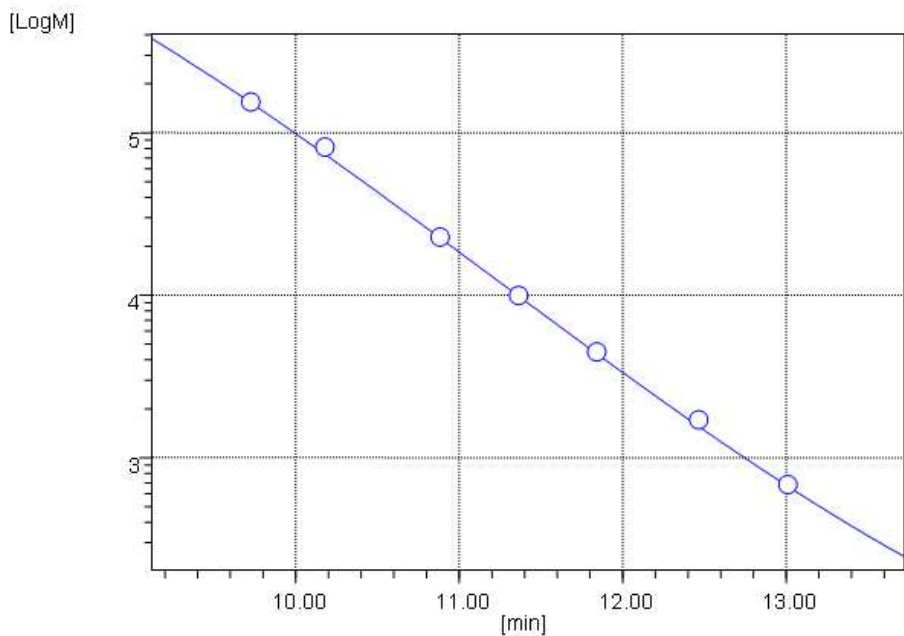
가수분해물의 분자량은 겔 여과 크로마토그래피(TOSOH ECOSEC, HLC-8320)를 사용하여 분석하였다. 동결건조 가수분해물을 증류수로 3 mg/mL 농도로 완전 용해 후 0.45 μm Nylon filter로 여과하고, 40°C의 온도와 0.5 mL/min의 유속으로 분석하였다. 사용된 컬럼은 TSKgel guard column SuperMP(PW)-H와 2 \times TSKgel SupermultiporePW-H(4.6 \times 150mm)이며, buffer 7의 전개용매를 사용하였고 표준물질 PEO(poly ethylene oxide)/PEG(poly ethylene glycol)의 크로마토그램과 Calibration data는 각각 Fig. 2-1과 Fig. 2-2에 나타내었다.



Y1 Axis: Chromatogram

Line	Data Name	Sample Name	RI/UV
R	RSLT0015	PEG,PEO R	RI
G	RSLT0016	PEG,PEO G	RI
Y	RSLT0017	PEG,PEO Y	RI

Fig. 2-1. Chromatogram of PEO(poly ethylene oxide)/PEG(poly ethylene glycol) standard



Calibration data (Rt)						Coefficient	
Time [min]	Molecular weight	Error [%]	Weight	Mark	Data name	A =	
9.782	135,800	-3.16292	1	STD	RSLT0015	B =	9.765497e-003
10.235	71,700	6.19337	1	STD	RSLT0017	C =	-3.281936e-001
10.940	20,000	-2.24628	1	STD	RSLT0016	D =	2.930852e+000
11.420	8,730	-2.79884	1	STD	RSLT0015		-1.259788e+000
11.898	3,930	-1.23583	1	STD	RSLT0017		
12.522	1,500	5.06036	1	STD	RSLT0016	Correlation	-1.000
13.067	600	-2.28813	1	STD	RSLT0015		

Fig. 2-2. Calibration data of PEO(poly ethylene oxide)/PEG(poly ethylene glycol) standard

2.2.2.3 SDS-PAGE에 의한 분자량 확인

Laemmli(1970)의 방법을 참고하여 SDS-PAGE 전기영동을 시행하였다. Stacking gel은 5% acrylamide gel을 사용하였고 H₂O 1.087 mL, 30% acrylamide mix 0.333 mL, 0.5 M Tris (pH 6.8) 0.5 mL, 10% SDS 0.02 mL, 10% APS(ammonium persulfate) 0.02 mL, TEMED(N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) 0.002 mL의 조성으로 제조하였다. Running gel은 12% acrylamide gel로서 H₂O 1.6 mL, 30% acrylamide mix 2.0 mL, 1.5 M Tris(pH 8.8) 1.3 mL, 10% SDS 0.05 mL, 10% APS 0.05 mL, TEMED 0.002 mL의 조성으로 제조하였다.

Sample의 준비는 제조한 액상 가수분해물을 미량냉장원심분리기로 12,000 rpm에서 3분 간 원심분리한 후, 2x sample buffer(4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue, 0.125 M Tris HCL)와 동량으로 섞고 10x loading dye를 넣어 총 100 μ L로 하여 100°C에서 10분 간 끓인 후 gel에 loading하였다.

전기영동 조건은 stacking gel을 지날 때까지 초반 50V의 전압을 유지하다가 이후 120mA로 높여 분리했으며, 전기영동이 끝난 gel은 staining buffer(coomassie blue R-250)와 destaining buffer(methyl alcohol 100 mL, acetic acid 100 mL, H₂O 800 mL)를 사용하여 염색 및 탈색을 하여 단백질 밴드를 관찰하였다.

2.2.3. 항산화 활성 측정

2.2.3.1. DPPH 자유 라디칼 소거 활성능

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 자유기 소거 활성은 Brand-Williams W 등(1995)의 방법에 따라 측정하였다. 0.5-5 mg/mL로 희석한 동결건조 가수분해물 200 μ L에 0.2 mM DPPH 용액 800 μ L를 가하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea). 양성 대조군으로 ascorbic acid(Sigma Chemical Co. USA)를 사용하여 표준 검량 곡선을 작성하였으며, 수율을 고려하여 Vitamin C equivalent antioxidant capacity(mg VCEAC/g total dried weight)로 환산하여 나타내었다.

2.2.3.2. ABTS 자유 라디칼 소거 활성능

ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt) 자유기 소거 활성은 Kim DO 등(2002)의 방법을 참고하여 측정하였다. 1 mM AAPH와 2.5mM ABTS(Sigma Chemical Co. USA)를 PBS(100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4)에 1:1로 섞어 70℃의 항온수조에 1시간 동안 반응시켜 ABTS 용액을 만들었다. ABTS 용액 1470 μ L와 동결건조 가수분해물을 0.5-2.5 mg/mL로 녹인 시료 30 μ L를 섞어 10분 간 반응시켰으며, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea). 양성 대조군으로 ascorbic acid(Sigma Chemical Co. USA)를 사용하여 표준 검량 곡선을 작성하였으며, 수율을 고려하여 Vitamin C equivalent antioxidant capacity(mg VCEAC/g total dried weight)로 환산하여 나타내었다.

2.2.3.3. FRAP 활성 측정

FRAP(ferric ion reducing antioxidant power) 활성은 Benzie IFF 등 (1996)의 방법을 참고하여 측정하였다. 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 용액, 그리고 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액을 10:1:1 비율로 혼합하여 37℃에서 가온한 것을 FRAP 용액으로 사용하였다. 동결건조 가수분해물을 2.5 mg/mL 농도로 희석한 시료용액 200 μL 와 FRAP 용액 1500 μL 를 섞어 실온에서 30분 간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea). Ascorbic acid(Sigma Chemical Co. USA)를 표준물질로 사용하여 수율을 고려한 FRAP 활성을 Vitamin C equivalent antioxidant capacity(mg VCEAC/g total dried weight)로 환산하여 나타내었다.

2.2.4. 관능적 특성 및 유리 아미노산 분석

2.2.4.1. 관능적 특성 평가

관능적 특성을 알아보기 위해 서울대학교 식품영양학과 구성원 중 단백질 급원에 알레르기 및 거부감이 없는 비숙련 패널 32명을 선정하여 실험의 목적과 검사 방법 등을 설명한 뒤 실험에 응하도록 하였다. 시료는 가수분해물의 액상형태 그대로 제공되었으며, 이를 위한 제조방법은 다음과 같다.

갈색거저리 유충 동결건조분에 식품첨가물로 사용될 수 있는 n-hexane(96.0%, Special grade, Samchun, Korea)을 5배 비율로 넣어 탈지과정을 2회 반복 후 식품건조기(LD-918BH, L' equip, Korea)를 사용하여 잔여 hexane을 제거하고 탈지분을 준비하였다. 갈색거저리 탈지분 45 g과 3차 증류수 900 mL를 혼합하고, 기질의 1%에 해당하는 450 μ L의 액상 효소(Alcalase, Flavourzyme)를 첨가하여 해당시간 만큼 가수분해물을 제조한 뒤 2,800 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 상층액만을 취하여 관능용 시료로 사용하였다.

액상의 갈색거저리 가수분해물을 개인 당 10 mL씩 제공받을 수 있도록 하였고, 시료를 1분 이내로 입에 머금으며 맛을 본 후 뱉어내는 방법으로 평가하였다. 13가지 시료의 색에 대한 기호도, 향에 대한 기호도, 맛에 대한 강도, 전체적인 기호도를 7점 척도로 평가하도록 하였다.

이전 시료가 다음 시료에 영향을 주지 않도록 각 시료 검사 후에 물로 입을 충분히 헹군 후 일정 시간 이후에 평가하도록 하였고, 본 연구는 서울대학교 생명윤리심의위원회(SNUIRB)에서 2016년 10월 10일에 승인 후 수행되었다(승인 번호: SNUIRB No. 1610/001-014).

2.2.4.2. 유리 아미노산 분석

동결건조 가수분해물을 증류수로 10 mg/mL 농도로 녹여 미량냉장원심분리기로 17,000 rpm에서 2분 동안 원심분리한 후, 상층액을 0.2 μ m PTFE syringe filter로 여과하여 아미노산 분석용 시료로 하였다. 분석 시료와 아미노산 표준품은 borate buffer, Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride(FMOC), o-phthaldialdehyde/2-mercaptopropionic acid(OPA.3-MPA) 시약과 혼합하여 유도체화 한 뒤, HPLC에 주입하였으며, 분석조건은 앞서 제시된 Table 1-2와 같다.

2.2.4.3. 아미노산 조성과 기호도 간의 상관관계

관능 평가 결과의 전체적인 기호도와 유리 아미노산 조성 간의 상관관계를 나타내기 위하여 SPSS Statistics(Ver. 21.0)을 이용하여 Pearson 상관분석을 실시하였다.

2.2.5. 통계 처리

본 연구의 모든 이화학적 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, IBM SPSS Statistics(Ver. 21.0) 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 나타내었다. 갈색거저리 가수분해물의 처리 조건 및 시간에 따른 실험 항목의 차이를 검정하기 위해 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 실시하였으며, Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 동일 집단군을 구분하였다.

Ⅲ. 실험결과 및 고찰

1. 황국균을 이용한 갈색거저리 발효액의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

1.1. 코지의 protease 활성도

Protease는 단백질을 가수분해하여 정미성 펩타이드 및 아미노산을 생산하는 중요한 인자로, 미생물에서 유래한 protease를 사용하여 식품산업에 활용하는 경향이 늘고 있다. 특히 *Aspergillus*속 곰팡이로부터 생산되는 neutral protease는 peptidase activity가 높으며 중성 pH 환경에서 소수성 아미노산 결합을 절단하여 쓴맛을 감소시킴으로써 식품 산업에서 많이 사용된다(Sandhya 등 2005). 그러므로 *Aspergillus*속 곰팡이에 속하는 황국균의 첨가 농도와 배양 시간을 달리하여 갈색거저리 코지를 제조하였고 이에 따른 protease 활성도를 Fig. 1-1에 나타내었다.

황국균을 0.5% 첨가한 경우, 활성도가 48시간까지 10.60 U/g로 증가하다가 60시간에 3.44 U/g로 감소하였고 1% 첨가한 경우에도 마찬가지로 48시간까지 19.29 U/g로 증가하다가 60시간부터 7.26 U/g로 감소하였다. 황국균을 1.5% 첨가한 경우에는 60시간까지 13.94 U/g로 증가하다가 72시간에 11.78 U/g로 감소하였다. Protease 활성도는 황국균의 첨가 농도와 배양 시간에 따라 달라졌고 본 연구에서는 황국균 1%를 첨가하여 48시간 동안 배양한 코지의 값이 19.29 U/g로 가장 높았다($p < 0.05$). 이는 protease 활성도가 일정 시간에서 최대 활성을 보인 후 감소된다는 Oh 등(2008)과 Seok 등(1994)의 보고와 유사하였다. 이를 바탕으로 protease 역가가 가장 높은 코지(1%, 48h)를 사용하여 소금물 담금 조건을 달리한 갈색거저리 발효액을 제조하였다.

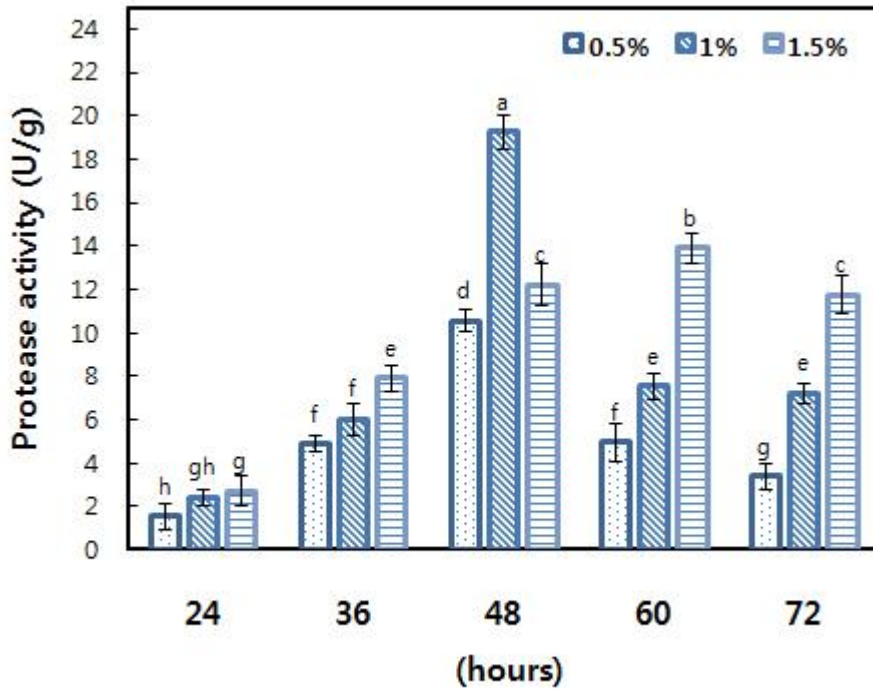


Fig. 1-1. Protease activity of *Tenebrio molitor* koji.

Values of different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$). 0.5, 1, 1.5%: *A.oryzae* concentration; 24, 36, 48, 60, 72 h: incubation time

1.2. 기간에 따른 특성 변화

1.2.1. 염도

소금물의 농도와 쌀가루의 첨가 유무를 달리하여 제조한 갈색거저리 발효액의 염도 결과를 Fig. 1-2에 나타내었다. 소금은 짠맛을 부여하며 식품의 풍미를 증가시키고 보존성에 영향을 미치나(Kim HJ 2015), 장기 보존을 위한 고농도의 소금은 염용성 아미노산의 분해를 저해할 수 있으므로(Lee KH 등 1997), 일반 소금 농도와 저염 농도로 나누어 실험 결과를 분석하였다.

숙성 30일부터 90일까지 일반 및 저염 실험군에서 기간이 지남에 따라 염도는 계속 증가하였다($p < 0.05$). HO군은 18.3-19.66%, HX군은 19.39-20.29%, LO군은 11.09-11.48%, LX군은 10.87-11.59%의 염도를 나타냈다.

숙성기간이 증가함에 따라 염도가 증가한 것은 숙성 중의 수분증발에 의한 수분함량의 감소가 원인일 것으로 사료되며(Kang SH 등 2011, Lee EY 2009), 일반 농도에서 O군이 X군보다 염도가 낮았던 것은 약용식물의 첨가(Kim YS 등 2008, Park SY 등 2015)가 염을 흡수함에 따라 염도가 낮아졌다고 보고한 바와 마찬가지로, 본 연구에서는 쌀가루 입자가 염을 더 많이 흡수했기 때문일 것으로 사료된다.

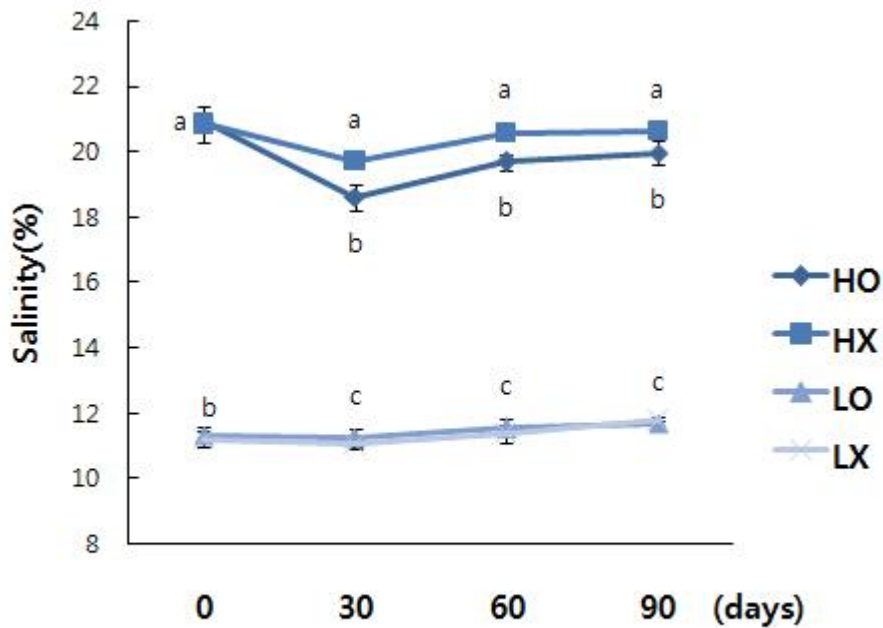


Fig. 1-2. Changes in salinity of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters in each time(days) are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.2.2. 일반세균수 및 대장균군 검사

소금물의 농도와 쌀가루의 첨가 유무를 달리하여 제조한 갈색거저리 발효액의 일반세균수 결과를 Table 1-3에 나타내었다.

식품공전(KFDA 2016)의 ‘장류’ 규격에 따르면 일반세균수에 대한 규격은 따로 정해져있지 않다. Kang JE 등(2013)은 전통식품 품질인증을 받은 시판 된장 제품에서 일반세균수가 최저 1.5×10^6 CFU/g에서 최고 2.5×10^9 CFU/g의 범위를 나타냈다고 하였으며, Lee SY 등(2013)도 중국 내 시판 한식 장류에서 된장은 6.85-7.89 log CFU/g, 찜장은 4.83 log CFU/g, 고추장은 6.22-6.41 log CFU/g, 간장은 5.02 log CFU/g을 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서는 일반 소금 농도에서 일반세균수가 숙성 30일부터 90일까지 4.46-2.31 log CFU/mL로 현저히 낮은 수치를 보이며 기간이 지남에 따라 계속 감소하였다. 이는 외부 미생물 투입을 막는 dialysis membrane의 사용과 열풍건조처리를 통한 갈색거저리의 전처리 방식에서 기인했을 것으로 사료된다. 또한 식염의 농도가 높을 경우, 잡균의 번식이 어려워 미생물의 오염이 잘 일어나지 않는 현상을(Kim JH 등 2006) 반영한다. 저염 농도에서는 숙성 30일부터 90일까지 7.04-5.45 log CFU/mL를 나타냈고 마찬가지로 기간이 지남에 따라 계속 감소하였다.

Bae MS(2008)의 연구에 따르면, 숙성 초기에는 산 생성과 무관한 호기성 미생물들이 증식하다가 숙성 중기 및 후기에 젖산균의 생육이 증가하면서 초기 미생물들의 증식을 억제하여 발효 4주차부터 일반세균수가 감소하였다. 본 연구에서도 모든 실험군에서 숙성 30일부터 기간이 지남에 따라 일반세균수가 지속적으로 감소함을 보였다.

대장균군은 저장기간 동안 모든 실험군에서 검출되지 않았다. 혼합장(살균제품)의 경우 대장균군의 검출은 음성이어야 하고(KFDA 2016), 본 연구의 시료는 살균 처리 전에 저장기간이 끝난 직후 바로 채취하여 검사하였으므로 장류식품의 대장균군 규격을 만족하였다고 볼 수 있다.

Table 1-3. Changes in total aerobic plate of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Type	(unit: log CFU/mL)		
	Storage time(days)		
	30	60	90
HO	4.46±0.06 ^c	2.82±0.07 ^g	2.31±0.25 ⁱ
HX	3.68±0.13 ^f	2.64±0.30 ^{gh}	2.44±0.18 ^{hi}
LO	6.09±0.24 ^c	5.98±0.11 ^c	5.45±0.25 ^d
LX	7.04±0.10 ^a	6.43±0.12 ^b	6.35±0.20 ^b

a-i) Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.2.3. pH 및 총 산도

소금물의 농도와 쌀가루의 첨가 유무를 달리하여 제조한 갈색거저리 발효액의 pH 및 총 산도를 Fig. 1-3에 나타내었다.

pH는 숙성 초기 모든 실험군에서 5.12-5.21의 범위로 나타났으며, LX를 제외하고는 시간이 지남에 따라 계속 감소하여($p<0.05$) HO는 5.11-4.78, HX는 5.03-4.76, LO는 5.16-4.98의 범위를 나타냈다(Fig. 1-3). LX의 경우, 시간이 지남에 따라 pH가 증감을 반복하며 5.55-5.49 범위에서 일정한 경향성을 보이지 않았다. 다른 실험군과 비교할 때 LX의 pH는 30일부터 90일까지 모든 기간에서 높았고($p<0.05$), pH 5.0 이하로 떨어지지 않았다. 이는 갈색거저리 발효액으로부터 용출된 유리아미노산 등의 완충작용이 pH의 감소를 완화시켰기 때문일 것으로 사료된다(Oh SC 2013, Park WP 등 2006).

총 산도는 모든 실험군에서 시간이 지남에 따라 계속 증가하였고($p<0.05$), 대체적으로는 기간마다 $LX>HX>LO>HO$ 의 순서로 높게 나타났다. 이를 통해 총 산도의 경우, 소금의 농도보다는 갈색거저리 열풍건조분의 함량이 영향을 크게 미쳤을 것으로 판단되었다. 갈색거저리에 함유된 단백질에 의한 산 함량 증가는 주로 젖산 생성에 의하며(Ketelaere 등 1974), X군이 O군보다 갈색거저리 열풍건조분을 2배 많이 함유하였으므로 갈색거저리의 높은 함량에 의한 젖산 생성이 X군의 총 산도를 높였을 것으로 판단된다.

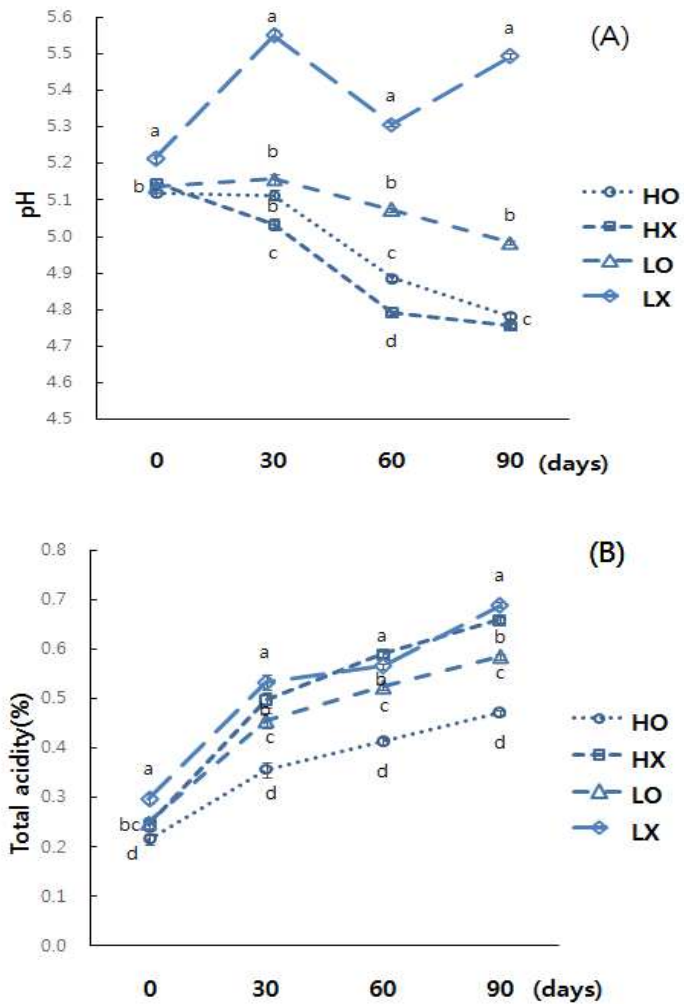


Fig. 1-3. Changes in pH and total acidity of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters in each time(days) are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.2.4. 색도 및 갈색도

소금물의 농도와 쌀가루의 첨가 유무를 달리하여 제조한 갈색거저리 발효액의 색도와 갈색도는 각각 Table 1-4와 Fig. 1-4에 나타내었다.

발효액의 명도(L값)는 LX를 제외한 모든 군에서 숙성 초기보다 30일에 감소하였고($p<0.05$) HO, HX, LO군에서는 기간이 지남에 따라 명도가 점점 낮아지거나 비슷하게 나타났다. Park IB 등(2005)과 Kim EY(2000)도 숙성 기간 중 된장의 명도가 감소하였다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 특히 LX군은 다른 실험군들과 비교할 때 숙성 60일과 90일에 모두 명도가 가장 낮았다($p<0.05$). 발효액의 황색도(b값)는 모든 군에서 숙성 초기에 비해 크게 달라지지 않아 기간에 따른 유의한 경향성은 나타나지 않았으나, 적색도(a값)는 모든 군에서 숙성 초기보다 30일에 증가하였고($p<0.05$), 특히 LX군은 다른 실험군들과 비교할 때 30일부터 90일까지 적색도가 가장 높았다($p<0.05$).

명도의 감소와 적색도의 증가를 바탕으로 갈색도의 결과를 볼 때 모든 군에서 갈색도는 적색도 변화와 마찬가지로 숙성 30일에 증가하였고, X군이 O군보다 높았으며 특히 LX군의 갈색도가 다른 실험군들에 비해 가장 높았다($p<0.05$). 이를 통해 갈색도를 증가시키는 원인은 숙성 기간의 증가와 갈색거저리 열풍건조분의 함량 증가가 모두 관련이 있을 것으로 사료된다. 숙성 기간이 지나면서 갈색거저리의 단백질에서 분해된 아미노산이 환원당과 반응하는 비효소적 갈변반응을 통해 갈색도가 높아졌을 것으로 본다. Jeon MS(2002)도 비효소적 갈변반응에 의해 간장의 갈변도가 숙성 기간에 따라 증가함을 관찰하였다. 갈색거저리 발효액을 만들기 위해 사용된 갈색거저리의 전처리는 고압증기멸균 및 열풍건조 과정을 모두 거친 것으로 열에 의해 효소가 불활성 되었을 것이며, 외부의 공기 및 미생물 유입을 차단하기 위해 dialysis membrane을 사용하였고, 내부의 공기만을 외부로 유출하는 발효용기를 사용하였기 때문에 본 연구의 갈변반응은 주로 비효소적 갈변반응에 의했을 것으로 판단된다.

Table 1-4. Changes in Hunter color value of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Type ²⁾		Storage time(days)			
		0	30	60	90
L ³⁾	HO	76.18±0.54 ^{aA,1)}	60.81±0.19 ^{cB}	61.87±0.61 ^{bA}	59.14±0.09 ^{dB}
	HX	70.05±0.75 ^{aC}	56.92±0.28 ^{dC}	57.79±0.32 ^{cB}	60.75±0.17 ^{bA}
	LO	71.49±0.12 ^{aB}	61.02±0.25 ^{bB}	57.16±0.16 ^{cC}	57.43±0.21 ^{cC}
	LX	46.64±0.11 ^{dD}	62.07±0.10 ^{aA}	52.02±0.30 ^{cD}	54.22±0.39 ^{dD}
a	HO	4.77±0.03 ^{dD}	12.76±0.04 ^{bD}	12.89±0.12 ^{aD}	12.62±0.02 ^{cD}
	HX	7.82±0.05 ^{cB}	15.80±0.08 ^{bB}	16.10±0.08 ^{aB}	15.79±0.02 ^{bB}
	LO	6.89±0.03 ^{dC}	13.83±0.07 ^{bC}	13.55±0.05 ^{cC}	15.60±0.07 ^{aC}
	LX	12.39±0.03 ^{dA}	18.33±.05 ^{cA}	22.55±0.13 ^{aA}	20.91±0.14 ^{bA}
b	HO	33.85±0.24 ^{aC}	33.11±0.10 ^{bC}	33.26±0.33 ^{bB}	32.36±0.53 ^{cC}
	HX	35.03±0.36 ^{bA}	32.99±0.16 ^{dD}	33.65±0.18 ^{cA}	35.40±0.13 ^{aA}
	LO	34.20±0.07 ^{aB}	34.24±0.15 ^{aB}	32.24±0.09 ^{cD}	33.46±0.13 ^{bB}
	LX	26.71±0.06 ^{dD}	37.06±0.06 ^{aA}	32.68±0.18 ^{cC}	33.56±0.24 ^{bB}

¹⁾Values are means±SD (n=5). Values of different superscript letters in each row(a-d), each column(A-D) are significantly different(p<0.05).

²⁾HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

³⁾L: lightness; a: redness; b: yellowness

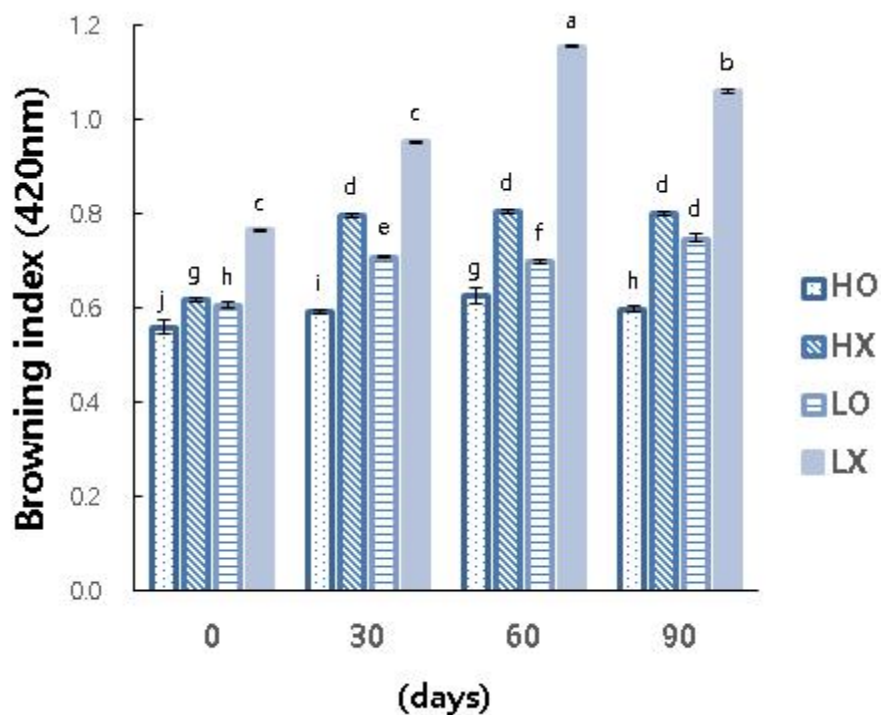


Fig. 1-4. Changes in browning index of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.3. 단백질과 탄수화물의 분해 양상

1.3.1. 총 질소 함량

갈색거저리 발효액의 총 질소 함량 변화는 Fig. 1-5에 나타내었다. 총 질소는 갈색거저리 함량이 많은 X군에서 높게 나타났고, 갈색거저리 함량을 기준으로 저염 조건인 L군에서 높게 나타나 숙성 30일부터 90일까지 LX>HX>LO>HO의 순서로 높았다($p<0.05$). 또한 모든 실험군에서 시간이 증가함에 따라 총 질소 함량도 계속 증가하였으며, 그 중 LX군의 총 질소 함량이 가장 높았다($p<0.05$).

발효 숙성이 계속되면서 미생물과 효소에 의해 갈색거저리 발효액으로 용출되는 단백질 분해산물이 증가함을 알 수 있었다. 숙성 초기에는 모든 실험군이 0.2-0.27(w/v%)의 범위였으나 숙성 30일부터 90일까지 HO는 0.33-0.41(w/v%)로, HX는 0.45-0.56(w/v%)로, LO는 0.39-0.53(w/v%)로, LX는 0.53-0.75(w/v%)로 지속적인 증가를 보였다.

콩을 사용하여 간장을 제조한 Kwon OJ 등(2010)은 숙성 90일째에 총 질소가 1.4%, Park HK(1997)은 콩을 사용한 저농도 청장의 총 질소가 90일 후 0.9%라고 보고하였고, Lim JH 등(2015)은 홍계를 *Aspergillus oryzae*로 발효시킨 어간장의 총 질소가 3개월 후 약 800mg/100g(0.8%)로 나타났다고 하여 본 연구 결과는 총 질소가 비교적 낮은 것으로 나타났다.

식품공전 ‘장류’ 규격에는 간장에 한하여 총 질소가 0.8(w/v%) 이상이어야 하고 한식간장의 경우 0.7(w/v%) 이상이라는 규격이 명시되어 있다. 90일까지 숙성시킨 LX의 경우 총 질소가 0.75(w/v%) 이었고, LX를 식품공전에서 정의하는 효소분해간장(단백질을 함유한 원료를 효소로 가수분해한 후 그 여액을 가공한 것)의 형태로 분류할 때, LX의 조건에서 갈색거저리 함량을 늘린다면 총 질소 함량을 높여 간장 규격을 충족할 수 있을 것이다.

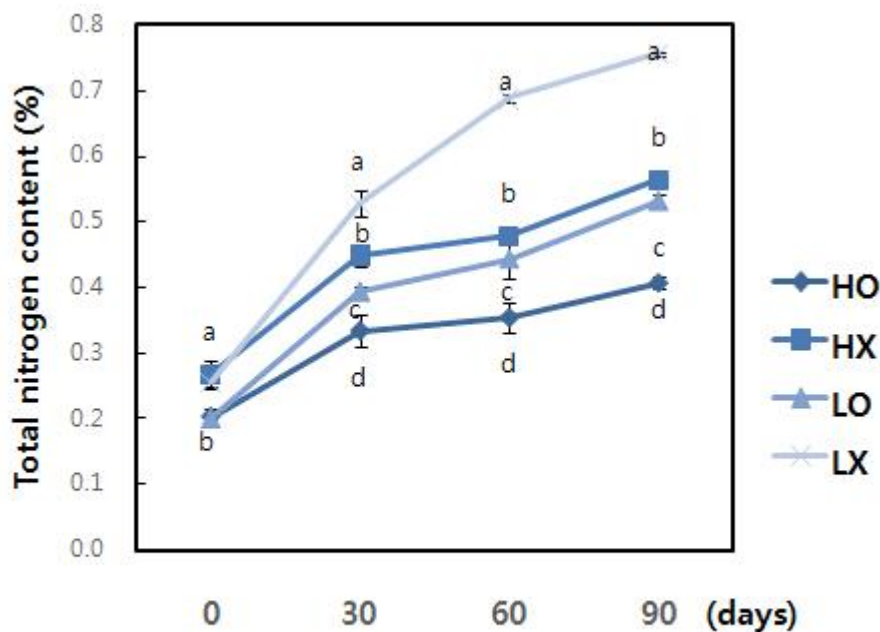


Fig. 1-5. Changes in total nitrogen content of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters in each time(days) are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.3.2. 아미노태 질소 함량

갈색거저리 발효액의 아미노태 질소 함량 변화는 Fig. 1-6에 나타내었다. 아미노태 질소는 protease의 작용으로 단백질이 가수분해 되어 맛을 내는 아미노산을 생성하는 것과 관련하여 식품의 품질지표항목으로 쓰이고 있다(Cho KM 등 2014).

아미노태 질소는 L군일수록 높게 나타났고 소금물 농도를 기준으로 X군에서 높게 나타났다. 이를 종합할 때, 숙성 30일부터 90일까지 LX>LO>HX>HO의 순서로 높았다($p<0.05$).

HO는 128.48-199.62 mg%로, HX는 151.83-271.18 mg%로, LO는 208.94-319.14 mg%로, LX는 369.45-539.96 mg%로 기간이 증가함에 따라 계속 증가하였으며, 그 중 LX군의 아미노태 질소 함량이 가장 높아 숙성 90일에는 539.96 mg%를 나타냈다($p<0.05$).

저염 환경에서는 특히 단백질 분해에 관여하는 protease의 활성이 더 높아지므로 아미노태 질소 함량이 증가하며(Byun MW 등 2015), Mok CK 등(2000)도 숙성기간의 경과와 더불어 식염 함량이 적은 경우 아미노태 질소가 더욱 증가하였다고 보고하였다. 또한 Kim JG(2004)에 따르면 아미노태 질소 함량이 높은 장류가 성분 면에서도 좋은 것으로 평가되는데, Kim JG(2004)은 콩을 사용하여 제조한 간장의 아미노태 질소 함량이 528.7 mg%라고 보고하여 본 연구의 90일 동안 숙성한 LX의 결과가 더 높은 것으로 나타났다.

Lee SK 등(2015)은 한국 전통 간장의 아미노태 질소가 28.23-139.30 mg%로 나타났고, 이는 시판 채래식 간장의 아미노태 질소가 252-518 mg%으로 나타난 것(Choi NS 등 2013)보다 현저히 낮다고 하였다. Choi NS 등(2013)에 따르면 아미노태 질소의 함량이 감칠맛과 풍부한 향미와 강한 양의 상관관계가 있다고 밝혀, 갈색거저리 발효액의 높은 아미노태 질소 함량은 관능적 특성에도 영향을 끼칠 것으로 사료된다.

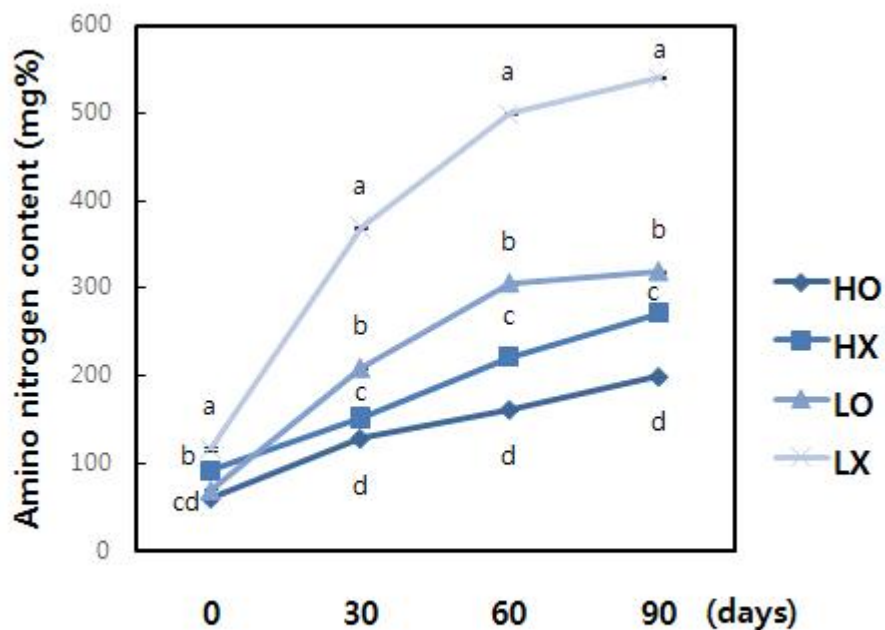


Fig. 1-6. Changes in amino nitrogen content of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters in each time(days) are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.3.3. protease 활성도

갈색거저리 발효액의 protease 활성도 변화는 Fig. 1-7에 나타내었다. protease는 단백질을 가수분해하여 polypeptide 혹은 구수한 맛 성분인 아미노산을 생성하므로 맛을 결정짓는 중요한 인자가 될 수 있다(Lee KH 등 2014).

Protease 활성도는 L군에서 높았으며, 기간이 증가함에 따라 X군에서 활성도가 증가했다. 또한 모든 실험군에서 숙성 90일에 protease 활성도가 감소하였다($p < 0.05$). 총 질소 및 아미노태 질소가 기간에 따른 증가를 보였던 것은 이와 같은 protease 활성도 증가와 연관이 있을 것이다(Lee KH 등 2014). 한편, 총 질소 및 아미노태 질소는 90일까지 지속적으로 증가한 반면 모든 실험군에서 protease 활성도는 90일에 감소하였다. 효소 활성이 감소하는 이유는 기질이 소모되어 활성이 감소하는 것과 관련이 있을 것이나(Lee SY 등 2012), Song YC(2013)의 연구에서는 비지 koji 100%를 첨가하여 90일까지 숙성시킨 간장의 protease 활성도가 5 U/mL 이하로 나타났고, Lee SY 등(2012)의 연구에서는 국내에 유통되고 있는 전통식품 품질인증 된장 24종 중 5종이 각각 4.41, 9.49, 9.49, 8.08, 8.08 U/g의 protease activity를 보인다고 하여, 본 연구의 상대적으로 효소역가가 보다 더 높았음을 나타냈다.

또한 효소 역가는 일정 기간에 최대값을 보이다가 감소하게 되는데(Oh HI 1997), 본 연구에서는 Oh HI(1997)와는 다르게 효소 역가가 완전히 실패된 것이 아니므로 단백질에서 가수분해된 펩타이드가 아미노산으로 더욱 분해되어 단백태 질소성분을 증가시키는 데에 있어 효소 활성의 존재가 영향을 계속 미쳤을 것으로 사료된다.

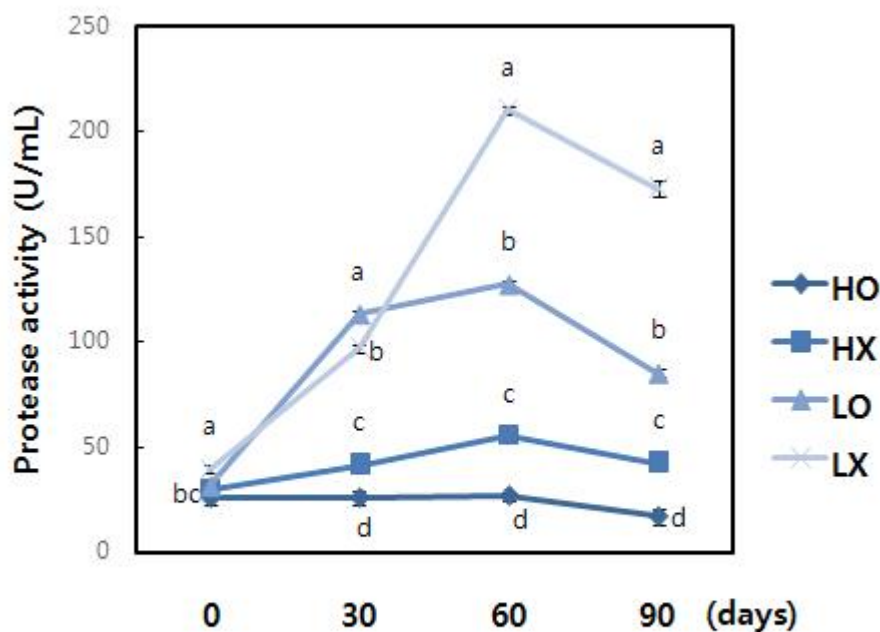


Fig. 1-7. Changes in protease activity of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters in each time(days) are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.3.4. 총 당 함량

갈색거저리 발효액의 총 당 함량 변화는 Fig. 1-8에 나타내었다. O군에는 볶음쌀가루를 첨가함으로써 숙성 초기에도 HO와 LO의 총 당 함량이 HX와 LX보다 높았다. 또한 H군에서는 숙성 기간이 지남에 따라 총 당 함량이 지속적으로 증가하였다($p<0.05$). 특히 HO는 숙성 90일의 총 당이 16.61%이었고 HX는 3.54%로, HO가 HX보다 약 4.7배 더 많은 당을 함유하였다.

반면, L군에서는 LO군에서 60일까지 총 당 함량이 증가하여 60일에 15.02%였으나 90일에는 13.13%로 감소하였고, LX군에서는 30일에 2.4%였던 당 함량이 90일까지 지속적으로 감소하여 90일에는 2.34%를 함유하였다.

Lee KS(1985)는 저염 환경에서는 미생물의 활동이 증가하여 당을 소비함으로써 알코올 발효나 유기산을 생성하고 산도를 증가시키므로 총 당 감소와 산도의 증가가 유의미한 상관성을 갖는다고 하였다. 본 연구에서는 특히 LX의 산도가 높았고, 이는 저염 환경에서의 총 당 감소와 관련이 있을 것으로 판단된다.

Jin TY 등(2008)도 황국이 함유한 amylase가 쌀가루를 분해하는 과정에서 전분질이 당분으로 분해됨과 동시에 당분이 발효 기질로 이용되어, 기간이 지남에 따라 총 당 함량이 감소할 수 있다고 하였다. 따라서 숙성 30일에는 HO와 LO의 총 당이 각각 11.86%, 9.2%로 HO가 더 높았으나, 숙성 60일에는 HO와 LO의 총 당이 각각 13.7%, 15.02%로 HO보다 LO가 더 높았다. 이후 숙성 90일에는 HO와 LO가 16.61%, 13.13%로 다시 HO의 총 당 함량이 높았다.

이를 종합할 때, amylase에 의해 쌀가루가 분해되어 당 함량을 높이는 것과 미생물에 의해 당이 소비되어 산도를 높이는 발효의 진행 과정이 동시에 일어나면서 총 당 함량이 증가 또는 감소하였던 것으로 판단된다.

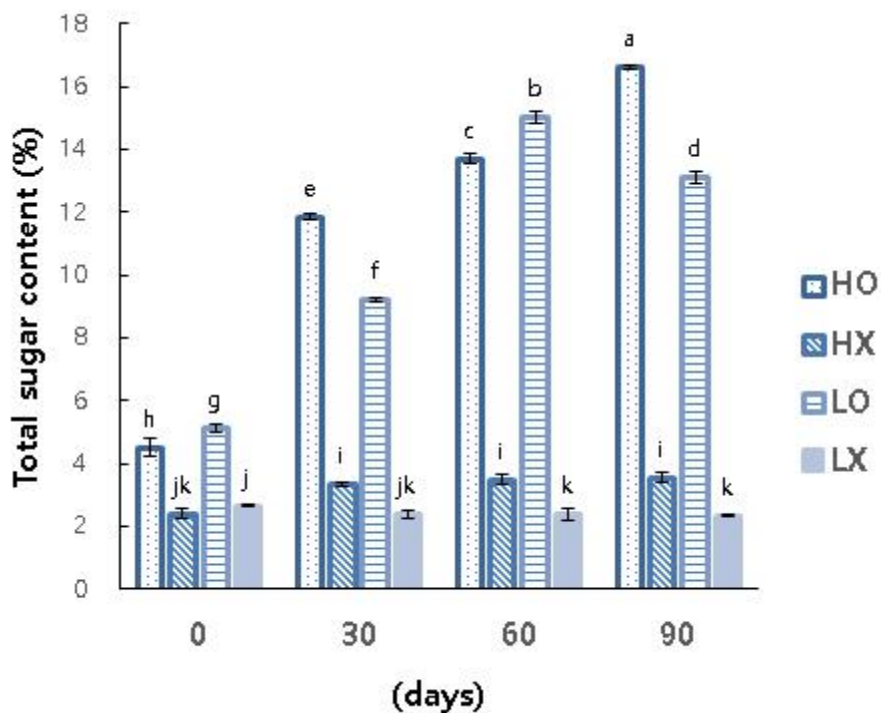


Fig. 1-8. Changes in total sugar content of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.3.5. 환원당 함량

갈색거저리 발효액의 환원당 함량 변화는 Fig. 1-9에 나타내었다. 환원당 함량의 변화는 총 당 함량의 변화와 유사한 결과를 보였다. O군에서 환원당 함량이 높았고 HO는 숙성 30일과 60일에 각각 2.3%, 3.83%, LO는 숙성 30일과 60일에 각각 3.82%, 5.83%로 LO가 HO보다 높았다 ($p<0.05$). 이는 식염 농도가 낮을수록 환원당 함량이 높다는 Cho KM 등(2014)의 연구와 일치하였다. 또한 HO는 90일까지 지속적으로 환원당 함량이 증가하였는데, 이는 미생물에 의해 환원당이 소비되는 것보다 전분질 원료 분해에 의해 환원당이 생성되는 양이 더 많기 때문으로 보인다(Lee JY 등 2010). 또, HX와 LO는 환원당이 숙성 60일까지 증가하다가 90일에 감소하였고 LX는 총 당과 마찬가지로 환원당 함량도 시간이 지남에 따라 지속적으로 감소하였다.

환원당은 숙성 기간 동안 단백질에서 분해된 아미노산과의 축합으로 비효소적 갈변 반응인 maillard 반응을 일으키며 함량이 낮아질 수 있으므로(Song YC 2013), 특히 LX의 환원당 함량이 계속 감소한 것이 LX의 높은 갈색도와 연관이 있을 것으로 판단된다. 이와 함께 간장에 함유된 당은 단맛을 부여함과 동시에 발효에 의해 여러 향기 성분과 유기산을 형성하며 maillard 반응을 통해 색을 형성한다는 Park HK 등(1997)의 연구를 통해, 90일까지 숙성시킨 갈색거저리 발효액의 환원당 감소는 맛, 향, 색과 같은 관능적 특성에 영향을 줄 것으로 사료된다.

또한 간장의 환원당은 2-5%일 때 좋은 품질인 것으로 판명되며(Luh BS 1995), 본 연구의 HO와 LO는 30일부터 90일까지 모두 이 범위에 해당하였다. Choi NS 등(2013)은 시판 대기업 생산 개량식 한식 간장의 환원당이 1.06-1.91%, 경기지역 소규모 생산 재래식 간장의 환원당이 0.13-1.94%로 나타났다고 하여 본 연구의 HX의 숙성 30일부터 90일까지의 환원당(1.92-1.7%)과 LX의 숙성 30일부터 90일까지의 환원당(1.47-1.11%)과 비교했을 때 갈색거저리 발효액의 환원당 함량은 기존에 판매되는 간장과 유사한 정도임을 확인할 수 있었다.

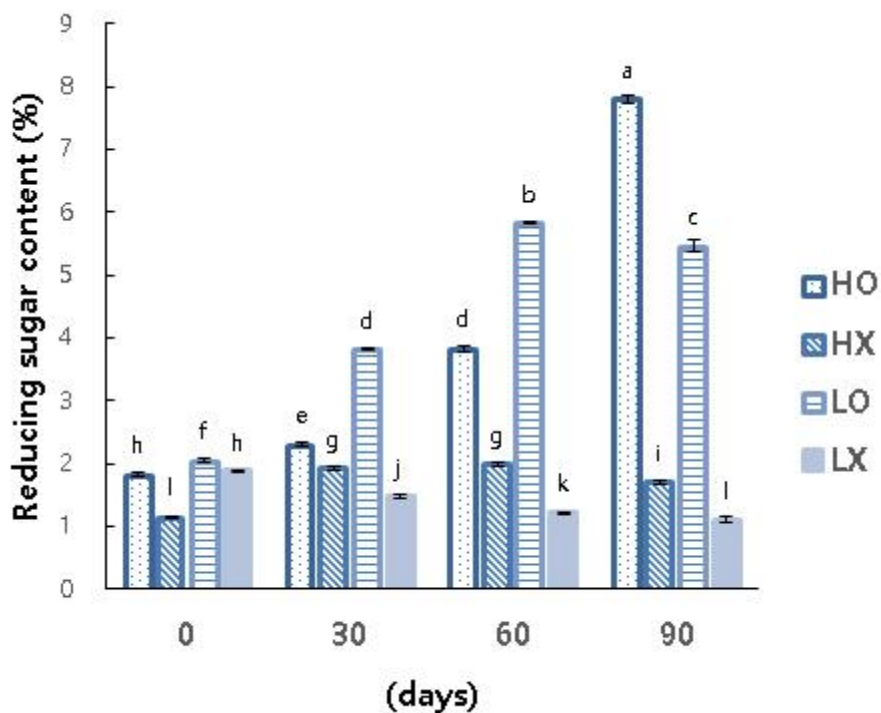


Fig. 1-9. Changes in reducing sugar content of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.3.6. amylase 활성도

갈색거저리 발효액의 amylase 활성도 변화는 Fig. 1-10에 나타내었다. 황국균은 α -amylase를 많이 함유하고 있어(Choi YH 등 2012), Kim HS 등(2010)도 황국균을 사용한 모든 발효물에서 발효 초기부터 α -amylase의 활성이 나타났다고 보고하였다. 본 연구 결과 또한 숙성 초기 amylase 활성도는 모든 실험군에서 125.60-146.59 U/mL의 범위로 시작하였다.

O군은 X군보다 amylase 활성도가 모두 높았고($p < 0.05$) HO는 숙성 30일부터 60일까지 163.23-172.19 U/mL로 증가, LO는 30일부터 60일까지 226.94-256.62 U/mL로 증가하였다. 그러나 HO와 LO 모두 숙성 90일에는 각각 38.70 U/mL, 71.16 U/mL로 감소하여 60일에 비해 활성도가 각각 4.45배, 3.6배 감소하였다.

X군은 갈색거저리만 함유하고 있는 것으로, Jones LD 등(1972)에 따르면 갈색거저리 유충이 함유하는 탄수화물은 생체의 3.61%이며, 건조중량 대비 8.53%이다. 즉, X군은 탄수화물 급원이 상대적으로 적어 O군보다 amylase 활성도가 낮았다. HX는 숙성 30일에 134.72 U/mL로 증가하였다가 60일에 137.45 U/mL로 비슷한 수준을 유지하였고 90일에는 38.7 U/mL로 60일에 비해 활성도가 4.45배 감소하였다. 또, LX는 숙성 30일에 147.48 U/mL로 증가하다가 60일에 138.92 U/mL로 감소한 후 90일에는 31.78 U/mL로 60일에 비해 4.4배 감소하였다.

amylase 활성도 또한 protease 활성도와 마찬가지로 갈색거저리 발효 숙성 90일에 감소하는 경향을 보였고 이는 기질인 전분질이 감소함에 따라 활성도가 낮아졌기 때문일 것으로 보인다.

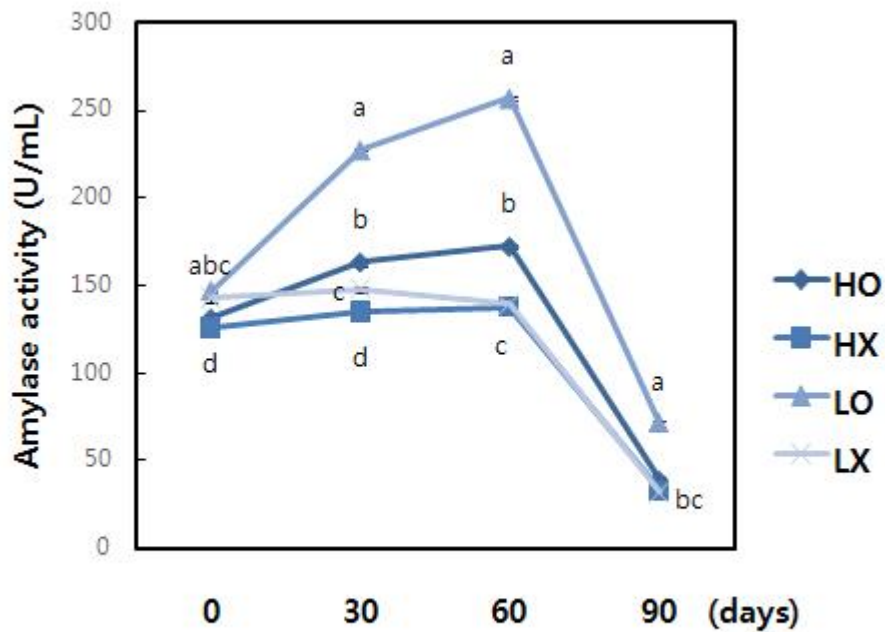


Fig. 1-10. Changes in amylase activity of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Values of different superscript letters in each time(days) are significantly different($p < 0.05$).

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

1.4. 관능적 특성 및 유리 아미노산 분석

1.4.1. 관능적 특성 평가

소금물의 농도와 쌀가루의 첨가 유무를 달리하여 90일까지 제조한 갈색 거저리 발효액의 관능적 특성은 7점 척도를 사용하여 강도 혹은 기호도로 평가하였으며, Table 1-5에 나타내었다.

향의 강도는 $LX > LO > HX > HO$ 순서로 높았고($p < 0.05$), 이는 LX에서 maillard 반응에 따른 여러 향기 성분과 유기산이 형성되어 나타난 결과로 보인다(Park HK 등 1997).

또한 맛의 강도는 짠 맛의 경우, H군이 L군보다 높았고 HO가 5.35, HX가 6.03으로 ‘약간 강하다’ 혹은 ‘강하다’ 정도로 평가되었다. 단 맛의 경우, O군이 HX보다는 높았으나, 4가지 시료 중에서는 LX가 3.53으로 가장 높았다. 이는 총 당 함량이 O군에서 X군보다 크게 높았음에도 불구하고, 관능적으로 느끼는 단 맛은 당 함량 외에도 다른 원인이 작용하기 때문으로 사료된다. 또한 구수한 맛의 경우에도 LX가 4.3으로 가장 높았다.

Yang ST(1984)는 당류 외에도 유리아미노산, 핵산관련물질, 유기산, 무기질 등 복합적인 요인이 맛에 영향을 끼친다고 하였다. 저염 환경에서 갈색거저리 열풍건조분이 더욱 많이 분해되어 질소 성분이 늘어나고 그 중 아미노산에서 감칠맛을 내는 성분들이 증가했을 것이라 사료되며, 이와 함께 간장 제조에서 예부터 사용되어 왔던 황국이 간장의 감칠맛의 주체인 글루탐산(Glu) 생성을 많이 하는 것으로 알려져 있어(Kim ND 2007) 갈색거저리 발효액의 단 맛과 구수한맛에 아미노산의 조성 및 함량이 영향을 크게 끼쳤을 것으로 본다. 한편, Choi KS(2003)와 Kim HS(1986)는 맥아를 섞어 만든 간장이 무첨가 대조군보다 기호도가 좋았다고 하여 본 연구 결과와 달랐다. 이는 본 연구에서 쌀가루와 갈색거저리의 혼합이 관능적으로 느껴지는 단맛을 증가시키는 데 효과를 나타내지 못했던 것으로 사료된다.

이미 혹은 이취의 강도는 전체적으로 비슷한 수준이라고 평가되었으며 3.10-3.5 범위로 나타났다. 전체 기호도는 HO가 4.1, HX가 3.65, LO가 4.68, LX가 4.9로, 저염 실험군에서 기호도가 더 높은 것으로 나타났다 ($p<0.05$). 특히 L군은 7점 척도에서 5점(약간 좋다)에 가까운 기호도 점수를 보여 저염 환경에서의 갈색거저리 발효액이 조미소재로서 활용될 가능성을 제시할 수 있을 것으로 본다.

Table 1–5. Sensory evaluation of *Tenebrio molitor* fermented liquids

Type	Aroma	Salty taste	Sweet taste	Savory taste	Off-flavor	Overall acceptance
HO(90)	3.45±1.20 ^b	5.35±0.89 ^b	2.70±1.32 ^b	3.30±1.40 ^b	3.15±1.55	4.10±1.32 ^b
HX(90)	3.88±1.45 ^b	6.03±0.77 ^a	2.48±1.57 ^b	3.35±1.25 ^b	3.50±1.84	3.65±1.17 ^b
LO(90)	3.95±1.30 ^b	4.33±1.12 ^c	2.90±1.50 ^{ab}	3.83±1.43 ^{ab}	3.10±1.60	4.68±1.10 ^a
LX(90)	5.03±1.31 ^a	4.18±1.24 ^c	3.53±1.75 ^a	4.30±1.51 ^a	3.13±1.80	4.90±1.37 ^a

Values are mean±SD (n=40). Values of different letters in each column are significantly different at p<0.05.

*HO(90): High salt concentration and Rice flour Addition fermentation for 90 days

HX(90): High salt concentration and Rice flour Non-addition fermentation for 90 days

LO(90): Low salt concentration and Rice flour Addition fermentation for 90 days

LX(90): Low salt concentration and Rice flour Non-addition fermentation for 90 days

1.4.2. 유리 아미노산 분석

단백질 분해산물이 증가하며 효소 활성은 감소한 숙성 90일을 종결점으로 보아, 소금물의 농도와 쌀가루의 첨가 유무를 달리하여 제조한 갈색거저리 발효액의 유리 아미노산 조성 및 함량을 숙성 초기(0일)와 숙성 90일 후로 비교하여 Table 1-6에 나타내었다.

아미노산은 전체적인 맛에 크게 관여하며 특히 glutamic acid, lysine, alanine, serine, isoleucine, aspartic acid 등이 영향을 준다고 알려져 있다(Lioe HN 등 2007). 90일 동안 숙성시킨 갈색거저리 발효액의 유리 아미노산 중에는 전체적으로 glutamic acid가 가장 많았고 이는 HO(90)의 11.36%, HX(90)의 11.11%, LO(90)의 12.42%, LX(90)의 15.16%의 비중을 차지하며 수치가 가장 높았던 LX(90)는 367.85 mg%의 glutamic acid를 함유하였다.

간장의 감칠맛의 주요 원인인 glutamate 함량이 높다는 선행연구는 Choi KS 등(2000), Fujimaki M 등(1974), Boudreau JC(1980)에서 보고된 바 있다. Choi KS 등(2000)은 메주를 20%의 소금물에 1:3 비율로 담글 경우 303.78 mg%의 glutamic acid를 함유하며, 비율을 줄여 1:1로 담글 경우 538.35 mg%까지 glutamic acid의 함량을 높일 수 있다고 보고하였다. 본 연구의 X군의 경우, 코지와 열풍건조분을 합한 갈색거저리고형분과 소금물의 비율이 1:7이며 HX의 경우 약 18%의 염도를 나타냈고 203.29 mg%의 glutamic acid를 함유하였다. 20%에 가까운 염도를 기준으로 비교했을 때, 기존의 콩단백질을 활용한 간장보다는 갈색거저리 발효액의 글루탐산 함량이 낮았으나 추후 소금물 담금 비율을 조정한다면 글루탐산 함량 및 총 아미노산의 함량을 기존 간장과 유사하게 증가시킬 수 있을 것이다.

특히 Tseng YH 등(2005)의 기준 분류에 따라 아미노산의 맛 성질을 비교했을 때, 감칠맛에 영향을 주는 Asp와 Glu이 LX에서 가장 높았고 ($p<0.05$), 단맛에 영향을 주는 Ala, Gly, Thr도 LX에서 가장 높았다 ($p<0.05$). 하지만 쓴맛에 영향을 주는 Ile, Leu, Met, Phe, Val 또한 LX

에서 가장 높은 것으로 나타났다($p<0.05$). 쓴맛 아미노산도 함께 증가한 것은 발효액의 숙성 기간에 따른 전체적인 아미노산 함량의 증가와 관련이 있는데, 본 연구에서는 LX의 관능 기호도가 높게 나타났으므로 쓴맛 아미노산의 출현이 갈색거저리 발효액을 맛보는 데에 부정적인 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

특이적으로 90일 동안 숙성시킨 LX에서만 serine, glutamine, tyrosine, arginine의 함량이 감소하였는데, 이는 일부 아미노산이 갈변 반응에 관여하며 감소하는 것과 관련이 있을 것으로 본다. Shin JH (2008)은 흑마늘의 숙성 중 arginine이 계속적으로 감소한다고 하였고, Ko SR 등 (1996)도 백삼의 증삼 제조과정 중 갈변반응기질로 arginine 등 10종의 아미노산이 감소한다고 보고하였다. Choi HS 등(2007) 또한 황태의 숙성 과정에서 histidine, glycine, aspartic acid가 갈변화 과정에서 감소되었다고 하였다. 따라서 90일 후 크게 감소한 아미노산은 갈변화 반응에 소모되었을 가능성이 있을 것으로 사료되며, MRPs(Maillard Reaction Products)의 생성은 휘발성 화합물 생성에도 영향을 끼쳐(Liu P 등 2012) 향의 강도가 5.03점(7점 만점)이었던 LX가 특유의 향을 났을 것으로 판단된다.

일부 아미노산이 갈변화 반응에 소모되었을 것임에도 불구하고, 유리 아미노산의 총 함량은 90일 후 증가하여 $LX>LO.HX>HO$ 순서로 높게 나타났다. 숙성 기간이 지남에 따라 단백질 및 펩타이드가 분해되어 생산된 아미노산의 함량이 계속적으로 증가하였다는 Jeon MS 등(2002)의 보고와도 일치하였으며, 특히 LX(90)의 총 유리 아미노산 함량은 2426.92mg/100g 인 것으로 나타나 4가지 실험군 중 가장 높았다.

Table 1-6. Free amino acids of *Tenebrio molitor* fermented liquids

(unit: mg/100g, wet basis)

Type					
Free Amino acids	Storage period (days)	HO	HX	LO	LX
Asp	0	13.14±0.10 ^g	17.83±2.32 ^{ef}	16.23±0.09 ^f	19.34±0.15 ^e
	90	57.87±1.15 ^d	78.69±1.21 ^c	127.93±3.53 ^b	189.49±1.59 ^a
Glu	0	52.12±0.97 ^g	60.11±3.89 ^f	60.07±0.50 ^f	75.72±0.56 ^e
	90	143.76±2.56 ^d	203.29±3.01 ^c	254.19±1.18 ^b	367.85±3.42 ^a
Asn	0	8.57±0.06 ^g	6.52±0.84 ^h	11.12±0.10 ^f	15.05±0.14 ^e
	90	34.55±0.54 ^c	49.96±0.69 ^a	38.38±0.52 ^b	27.23±0.57 ^d
Ser	0	17.57±0.19 ^f	23.14±0.11 ^e	21.82±0.22 ^e	29.76±0.24 ^d
	90	65.65±1.10 ^c	94.73±1.57 ^b	118.61±1.30 ^a	4.71±0.14 ^g
Gln	0	11.69±0.08 ^h	14.23±0.49 ^g	15.17±0.27 ^f	20.36±0.11 ^d
	90	36.92±0.54 ^b	51.29±0.69 ^a	27.71±0.68 ^c	16.12±0.64 ^e
His	0	19.37±0.65 ^f	25.41±0.41 ^e	20.31±1.73 ^f	26.68±0.47 ^e
	90	44.59±0.68 ^d	62.40±1.28 ^c	80.98±3.72 ^b	108.85±3.05 ^a
Gly	0	12.19±0.13 ^h	17.24±0.11 ^f	15.21±0.08 ^g	20.98±0.06 ^e
	90	44.04±0.63 ^d	62.53±0.80 ^c	101.44±1.66 ^b	133.94±0.47 ^a
Thr	0	18.62±1.14 ^h	24.57±0.27 ^f	22.08±0.98 ^g	29.45±0.09 ^e

	90	65.51±0.26 ^d	90.16±2.34 ^c	112.85±1.70 ^b	154.53±1.10 ^a
Arg	0	42.37±0.42 ^g	62.79±1.02 ^e	49.33±0.79 ^f	70.14±0.56 ^d
	90	109.85±2.04 ^c	161.56±1.39 ^a	138.14±2.24 ^b	3.51±0.21 ^h
Ala	0	34.67±0.20 ^h	49.86±0.33 ^f	38.68±0.46 ^g	56.09±0.57 ^e
	90	99.57±1.58 ^d	144.89±1.92 ^c	198.17±3.41 ^b	268.10±1.12 ^a
Tau	0	0.69±0.01 ^h	1.08±0.03 ^b	0.69±0.03 ^g	1.02±0.01 ^c
	90	0.93±0.03 ^d	1.55±0.05 ^a	0.79±0.02 ^f	0.88±0.03 ^e
GABA	0	2.11±0.01 ^c	2.31±0.02 ^b	2.09±0.03 ^c	2.19±0.04 ^{bc}
	90	2.27±0.16 ^b	2.18±0.07 ^{bc}	3.29±0.05 ^a	3.25±0.06 ^a
Tyr	0	30.71±0.33 ^f	41.08±0.09 ^d	36.36±0.84 ^e	48.76±0.25 ^b
	90	43.01±0.66 ^c	54.14±0.56 ^a	36.31±0.29 ^e	35.54±0.35 ^e
Val	0	27.85±0.16 ^h	38.53±0.07 ^f	31.92±0.19 ^g	43.84±1.49 ^e
	90	86.35±1.55 ^d	121.82±1.98 ^c	166.88±3.89 ^b	226.39±1.63 ^a
Met	0	4.19±0.06 ^g	5.51±0.36 ^f	5.31±0.21 ^f	6.84±0.64 ^e
	90	19.35±0.11 ^d	27.47±0.78 ^c	30.04±0.81 ^b	38.63±0.90 ^a
Trp	0	10.14±0.30 ^g	13.72±0.20 ^f	12.52±0.37 ^f	16.29±0.07 ^e
	90	22.88±0.86 ^d	28.74±0.34 ^c	35.74±1.42 ^b	51.12±0.88 ^a
Phe	0	15.01±0.27 ^g	20.19±0.28 ^f	18.95±0.47 ^f	25.86±0.24 ^e
	90	50.23±1.24 ^d	70.86±0.83 ^c	84.58±0.87 ^b	105.48±1.10 ^a
Ile	0	17.99±0.23 ^h	24.01±0.09 ^f	21.36±0.42 ^g	29.63±0.28 ^e
	90	63.03±1.19 ^d	89.21±1.11 ^c	114.05±1.98 ^b	152.37±1.17 ^a

Leu	0	29.29±0.15 ^h	39.28±0.36 ^f	36.00±0.41 ^g	49.59±0.42 ^e
	90	117.81±1.95 ^d	169.58±1.50 ^c	193.30±3.48 ^b	253.00±0.86 ^a
Lys	0	35.53±0.22 ^g	40.63±0.64 ^f	38.32±0.60 ^f	46.20±0.26 ^e
	90	84.54±1.66 ^d	124.07±0.78 ^c	127.23±1.73 ^b	181.22±3.30 ^a
Pro	0	35.94±0.61 ^g	88.01±2.07 ^d	39.03±1.01 ^g	91.87±2.11 ^c
	90	73.19±0.96 ^e	140.07±1.02 ^a	56.55±3.12 ^f	104.72±2.03 ^b
Total	0	439.77±6.30	616.07±14.01	512.56±9.81	725.66±8.79
	90	1265.90±21.48	1829.21±23.91	2047.16±37.61	2426.92±24.60

a-h) Means with different letters in each free amino acids result are significantly different at $p < 0.05$

*HO: High salt concentration and Rice flour Addition

HX: High salt concentration and Rice flour Non-addition

LO: Low salt concentration and Rice flour Addition

LX: Low salt concentration and Rice flour Non-addition

2. 단백질분해효소를 이용한 갈색거저리 가수분해물의 특성 및 조미소재 이용가능성 탐색

2.1. 가수분해물의 수율

단백질분해효소 처리를 달리하여 제조한 갈색거저리 가수분해물의 수율은 Fig. 2-3과 같다. 효소 처리를 하지 않은 C의 수율은 15.47%였고 효소 처리를 한 A군(Alcalase 처리), F군(Flavourzyme 처리), AF군(Alcalase + Flavourzyme 복합처리)은 모두 C보다 수율이 높았다($p < 0.05$). A군과 F군은 시간이 증가함에 따라 수율도 지속적으로 증가하여, A군은 1시간부터 8시간까지 37.72-53%, F군은 23.62-29.24%의 범위로 나타났다. Cheung 등(2010)은 새우 가공부산물을 기질로 할 때 효소 처리를 하지 않은 Control군은 5% 정도의 낮은 수율을 보였으나, Alcalase와 Flavourzyme 효소 처리군에서 수율이 모두 높아졌고 Alcalase는 30% 이상의 수율을, Flavourzyme은 20%정도의 수율을 보인다고 하여 본 연구 결과와 마찬가지로 A군이 F군보다 높았다.

반면, AF군은 처리 시간에 따라 증가 혹은 감소를 반복하였다. 효소가 기질에 작용하는 부위가 각기 다름에 따라 peptide의 형성 및 소수성, 친수성기의 생성이 복합적으로 나타나 가수분해물의 solubility에 영향을 줄 수 있으며(Cheung 등 2010), 가수분해물의 표면 소수성이 높을수록 soluble yield는 낮아진다(Tang CH 등 2009). 효소가 복합 처리된 AF군은 endopeptidase인 Alcalase가 표면 소수성이 낮은 oligo-peptide를 형성(Tang CH 등 2009)한 이후에 exopeptidase를 함유한 Flavourzyme이 peptide 잔기를 절단하게 된다. 이 때 표면 소수성이 높아지면 soluble yield는 감소되고, 표면 소수성이 낮아지면 AF8과 같이 soluble yield가 증가하는 것으로 볼 수 있다. 전반적으로는 A군>AF군>F군의 순서로 수율이 높게 나타났고, Alcalase와 Flavourzyme의 처리가 갈색거저리 탈지분 가수분해물을 얻는 데 효과가 있음을 확인하였다.

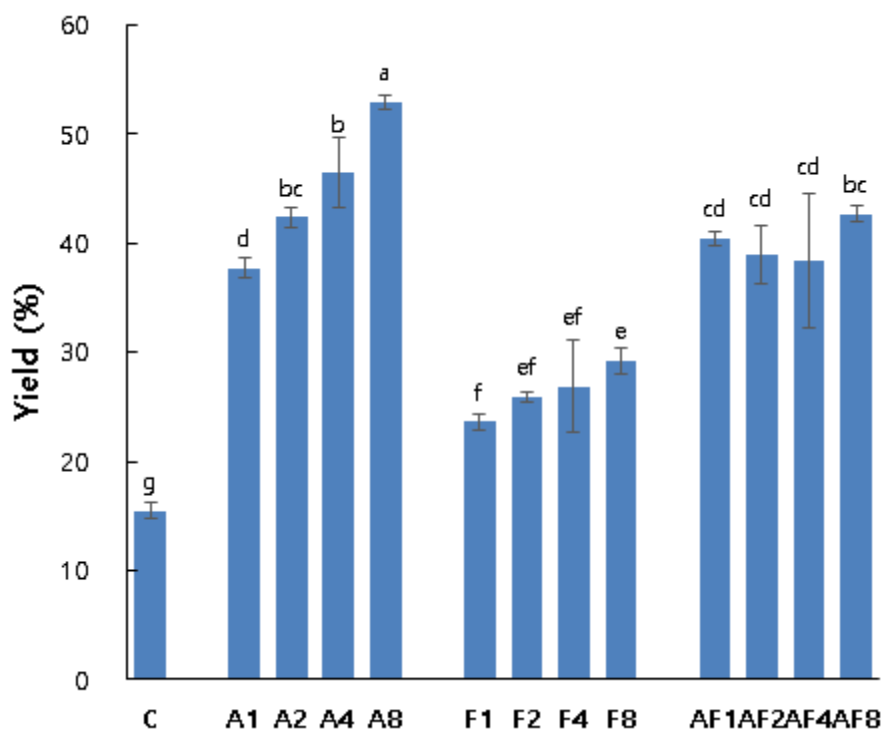


Fig. 2-3. Yield of *Tenebrio molitor* hydrolysates

Values of different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

*C: control; A: Alcalase processing; F: Flavourzyme processing; AF: pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for the remainder of the hours;

1, 2, 4, 8: processing time(hours)

2.2. 가수분해도

단백질분해효소 처리를 달리하여 제조한 갈색거저리 가수분해물의 가수분해도를 Fig. 2-4에 나타내었다. 가수분해도 측정은 α -amino nitrogen 함량을 측정하는 것으로, 유리 아미노산 혹은 폴리펩타이드 N-말단의 유리 아미노기를 정량하여 나타낸다(Wallace JM 1998).

가수분해도는 F군과 AF군에서 시간에 따라 계속 증가하여($p < 0.05$) F군은 23.49-29.66%의 범위로, AF군은 21.68-34.27%의 범위로 나타나며 시간이 증가함에 따라 AF군의 가수분해도가 더 큰 폭으로 증가하였다. 반면, A군은 15% 미만으로 일정한 수준에서 증가하지 않았다. Adler-Nissen(1986)은 Alcalase 2.4L를 사용한 가수분해물에서 가수분해도가 20% 미만으로 나타난 이유를 유리아미노산 및 dipeptide 함량이 낮았기 때문이라고 밝혔고, Guerard 등(2002)에서도 Flavourzyme이 Alcalase보다 가수분해도가 높았으며, Chang C Y 등(2007)은 시간이 증가함에 따라 Alcalase 처리에 따른 가수분해도는 1시간부터 8시간까지 일정 수준에서 유지되었으나 Flavourzyme 처리에 따른 가수분해도는 1시간부터 6시간까지 계속 증가했다고 밝혀 본 연구 결과와 매우 유사하였다.

또한, 본 연구에서는 효소 처리를 하지 않은 대조군(C)이 A군보다 가수분해도가 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 갈색거저리 탈지분의 가수분해물 제조 과정에 있어 자가소화(autolysis)가 일어났을 것으로 사료된다. 갈색거저리 유충의 중장(midgut)에는 endopeptidase('Tenebrio trypsin')와 exopeptidase(carboxypeptidase B, amino-tripeptidase)가 함유되어 있으며 endopeptidase는 trypsin, chemotrypsin 등의 serin protease의 형태로 분류될 수 있다(Applebaum SW 등 1964). 또한 Applebaum SW 등 (1964)에 따르면, trypsin이 인간의 체내에서 효소활성을 높게 띠는 온도는 37°C인 반면, 변온 동물인 갈색거저리 유충의 경우에는 37°C 이상에서도 효소가 활성을 띠어 50°C 부근에서 최대 활성도를 보였다. 따라서 본 연구에서 처리한 온도(55°C)에서도 효소 활성이 유

지될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 갈색거저리 탈지분을 준비하기 위해 동결건조와 n-hexane 처리 과정을 거쳤으나, 동결건조과정에서는 효소활성의 저해를 최소화할 수 있으며, hexane 처리에서도 이질바퀴(*Periplaneta americana*)의 protease 활성도가 영향을 받지 않고 계속 유지할 수 있었다고 하여(Sanatan PT 등 2013), 갈색거저리가 함유한 protease의 활성이 유지되어 대조군에서 자가분해(autolysis)가 나타났을 것으로 사료된다. 그리고 효소의 활성은 최적 온도, pH를 가지며 해당 환경에서 우세한 효소 활성이 달라지므로, 효소 처리군에서는 갈색거저리가 함유하고 있는 효소 보다는 해당 처리 효소인 Alcalase와 Flavourzyme이 우세한 활성을 보여 A군의 가수분해도는 Alcalase에 의한 영향을 크게 받아 유리 아미노산이나 펩타이드 N-말단의 유리 아미노기 함량이 적었던 것으로 보인다.

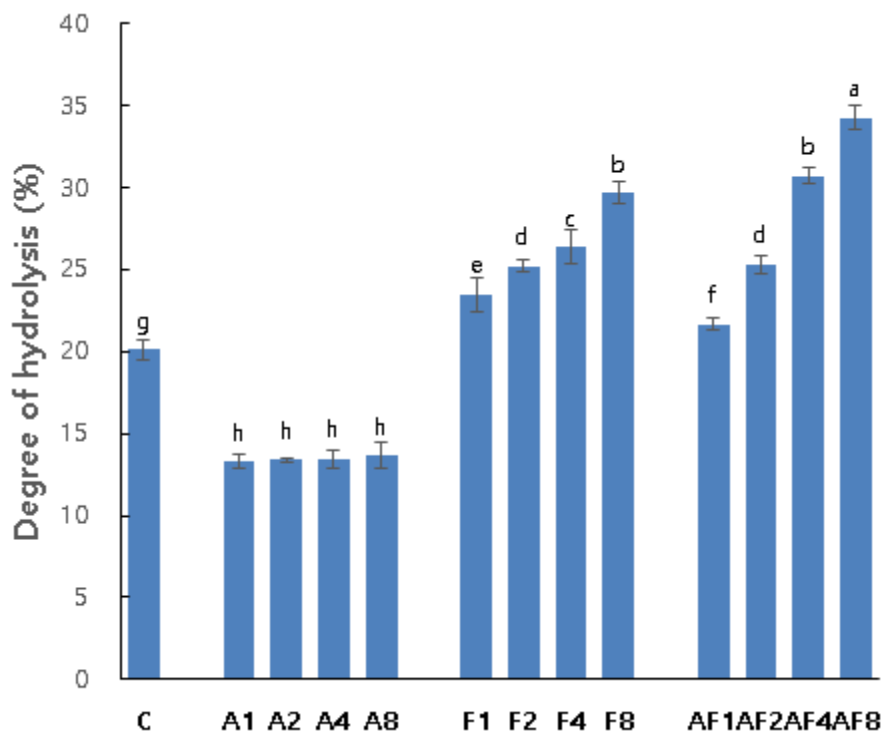


Fig. 2-4. Degree of hydrolysis of *Tenebrio molitor* hydrolysates

Values of different superscript letters are significantly different($p < 0.05$).

*C: control; A: Alcalase processing; F: Flavourzyme processing; AF: pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for the remainder of the hours;

1, 2, 4, 8: processing time(hours)

2.3. Size Exclusion Chromatography 분석

단백질분해효소 처리를 달리하여 제조한 갈색거저리 가수분해물의 SEC(Size Exclusion Chromatography) 결과를 Fig. 2-5 및 Table 2-2에 나타내었다.

크로마토그램은 C, A군, F군, AF군마다 서로 상이하게 나타났으며, 이는 효소의 기질 절단 부위가 달라 분자량 분포에 차이를 주었기 때문이다. 본 연구에서의 SEC 분자량 개념은 절대분자량이 아닌 표준물질에 대한 상대분자량 개념이며(Oliva 등 2001), 본 연구의 크로마토그램에서는 일정 시간대에 해당되는 각 peak의 출현이 유사하게 나타났다. 따라서 분자량 분포를 개략적으로 추정하기 위해 C, A군, F군, AF군에서 같은 시간대별로 구분한 각 peak(peak1-peak7)의 가장 높은 분자량(Mp:Molecular weight at peak)을 다시 평균화하여 Table 2-2 하단부에 각주로 나타냈다.

C에서는 peak1(평균 Mp: 238,649)에서 면적 비중(Area, %) 및 면적 값(Area, mV*sec)이 전체 효소 처리군보다 높아 분자량이 큰 단백질이 상대적으로 많이 존재함을 확인하였고, C에서만 peak2(Mp: 4,677)가 단독으로 존재하여 Alcalase 혹은 Flavourzyme의 효소 처리는 상대적으로 큰 분자량의 펩타이드를 분해한다는 것을 알 수 있었다.

A군은 2시간까지 peak3(평균 Mp: 768)의 면적 값이 효소 처리군 중 가장 높았으나 면적 값은 점점 감소하였다. 또한, F군과 비교하였을 때 2시간까지는 peak4-6(평균 Mp: 210, 101, 18)의 면적 값이 모두 컸으나, 4시간부터 8시간까지는 A군보다 F군이 더 크게 나타나 시간이 지남에 따라 exo-peptidase를 함유한 Flavourzyme이 endo-peptidase를 함유한 Alcalase보다 분자량이 더 작은 분해산물을 많이 생성함을 알 수 있었다.

AF군은 peak4-7의 면적 값이 효소 처리군 중에서 대체적으로 가장 높았다. AF군은 시간에 따른 가수분해도 증가 폭이 가장 높았던 것을 고려할 때, Alcalase와 Flavourzyme의 2단계 처리에 의해 저분자 펩타이드

및 유리 아미노산이 빠르게 많이 생성된 것으로 보인다. 또한 A군과 마찬가지로 효소 처리 시간이 지남에 따라 peak3의 면적 값이 크게 감소하여, peak3의 분포는 Alcalase 처리에 의해 oligopeptide가 생성되고 이후 저분자 펩타이드로 분해(Qin과 Ding 2006)되는 것과 관련 있을 것으로 사료된다.

F군은 peak1의 면적 값이 C보다는 낮았으나 A군, AF군보다는 높았다. 이는 exopeptidase를 함유한 Flavourzyme이 아미노산 말단을 제거함과 동시에 큰 분자량의 폴리펩타이드를 상대적으로 많이 생성(Hamada JS 2000)하기 때문으로 사료된다. 또한 peak3의 면적 값은 A군, AF군과는 다르게 시간에 따라 감소하지 않아 Flavourzyme에 의해 폴리펩타이드가 분해됨에 따라 oligopeptide를 생성했을 것으로 본다. Peak5, peak6, peak7의 면적 값은 2시간부터 시간이 증가함에 따라 계속 증가하였다.

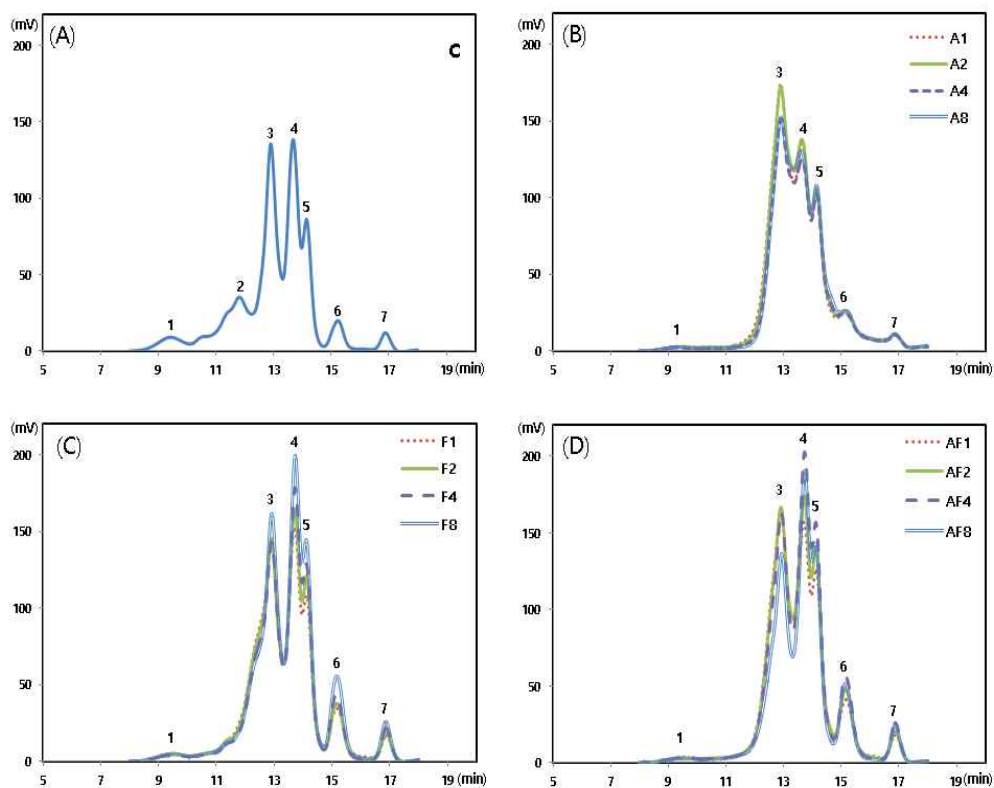


Fig. 2-5. Chromatogram of *Tenebrio molitor* hydrolysates by size exclusion chromatography

(A): C(control); (B): A(Alcalase processing); (C): F(Flavourzyme processing); (D): AF(pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for the remainder of the hours);

1, 2, 4, 8: processing time(hours)

Table 2-2. Comparison area(%) and area(mV*sec) of *Tenebrio molitor* hydrolysates by size exclusion chromatography

Type ²⁾ Peak ¹⁾	C	A1	A2	A4	A8	F1	F2	F4	F8	AF1	AF2	AF4	AF8
	Area(%)												
1	4.06	1.19	1.08	1.12	0.98	2.14	1.94	1.75	1.65	1.31	1.19	1.19	1.07
2	16.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	32.17	49.41	47.96	43.81	42.36	48.63	46.96	44.7	41.97	46.06	41.51	38.59	35.67
4	27.67	23.03	23.6	24.31	26.17	23.31	27.14	26.06	25.24	24.41	26.31	28.51	29.59
5	12.5	16.56	17.85	21.4	20.72	15.84	14.25	16.49	18.53	16.88	18.07	18.76	19.14
6	4.4	7.69	7.26	7.31	7.63	7.51	7.11	7.99	9.39	8.66	8.92	9.69	9.82
7	2.24	2.12	2.25	2.05	2.14	2.58	2.59	3.01	3.22	2.67	4.00	3.27	4.72
Peak	Area(mV*sec)												
1	571.91	217.64	197.78	186.22	167.64	374.69	345.83	310.87	322.14	246.92	237	238.42	188.36
2	2386.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	4528.9	9032.03	8783	7305	7270.8	8522.2	8353.8	7957.9	8186.08	8670.64	8251.21	7752.26	6297.87
4	3895.1	4209.76	4322.6	4052.9	4491.7	4084.7	4828	4638.9	4923.4	4595.61	5230.36	5728.27	5223.31
5	1759.8	3027.34	3268.22	3569.5	3556.79	2775.7	2534.21	2936.14	3613.74	3176.78	3591.16	3769.22	3378.41
6	619.47	1405.86	1328.9	1218.6	1310.26	1316.4	1265.5	1422.1	1830.5	1630.35	1773.05	1946.26	1733.17
7	315.88	387.24	412.74	342.28	367.94	451.51	461.3	536.12	628.81	502.99	794.56	656.84	883.67

¹⁾ Average Mp(Molecular weight at peak) of peak1: 238,649; peak2: 4,677; peak3: 768; peak4: 210; peak5: 101; peak6: 18; peak7: 1

²⁾ C: control; A: Alcalase processing; F: Flavourzyme processing; AF: pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for the remainder of the hours; 1, 2, 4, 8: processing time(hours)

2.4. SDS-PAGE에 의한 분자량 확인

단백질분해효소 처리를 달리하여 제조한 갈색거저리 가수분해물의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 2-6과 같다. 200 kDa부터 7 kDa까지의 범위를 가진 marker를 사용하여 단백질 밴드를 확인한 결과, C에서는 뚜렷한 밴드가 여러 개 관찰되었으나 A군, F군, AF군에서는 관찰되는 밴드가 없거나 희미하게 나타나 단백질이 저분자 펩타이드로 가수분해 되었음을 확인할 수 있었다.

C에서는 200-100 kDa 사이에서 밴드가 관찰되었고 100-70 kDa 사이에서 1개의 뚜렷한 밴드, 50 kDa 부근에서 1개의 뚜렷한 밴드, 50-35 kDa 사이에서 3개의 뚜렷한 밴드가 관찰되었으며 35-24 kDa 사이에서 여러 개의 밴드, 20-7 kDa 사이의 15 kDa 부근에서 여러 개의 밴드가 발견되었다.

Roberts PE(1980)는 *Tenebrio molitor*의 late larva(탈피 후 24시간 방치)형태의 각피(cuticle) 단백질에서 86 kDa에서 밴드가 발견되었고, 24-6.5 kDa 사이에서 여러 개의 밴드가 관찰되었다고 밝혔다. 본 연구에서 사용된 갈색거저리 유충은 탈피 후 번데기가 되기 전인 노령 유충에 해당하나, 각피(cuticle) 뿐 아니라 곤충 전체를 사용했으므로 Roberts PE(1980)에서 관찰된 밴드와 유사한 분자량뿐 아니라 동시에 다양한 밴드를 함께 나타내었다.

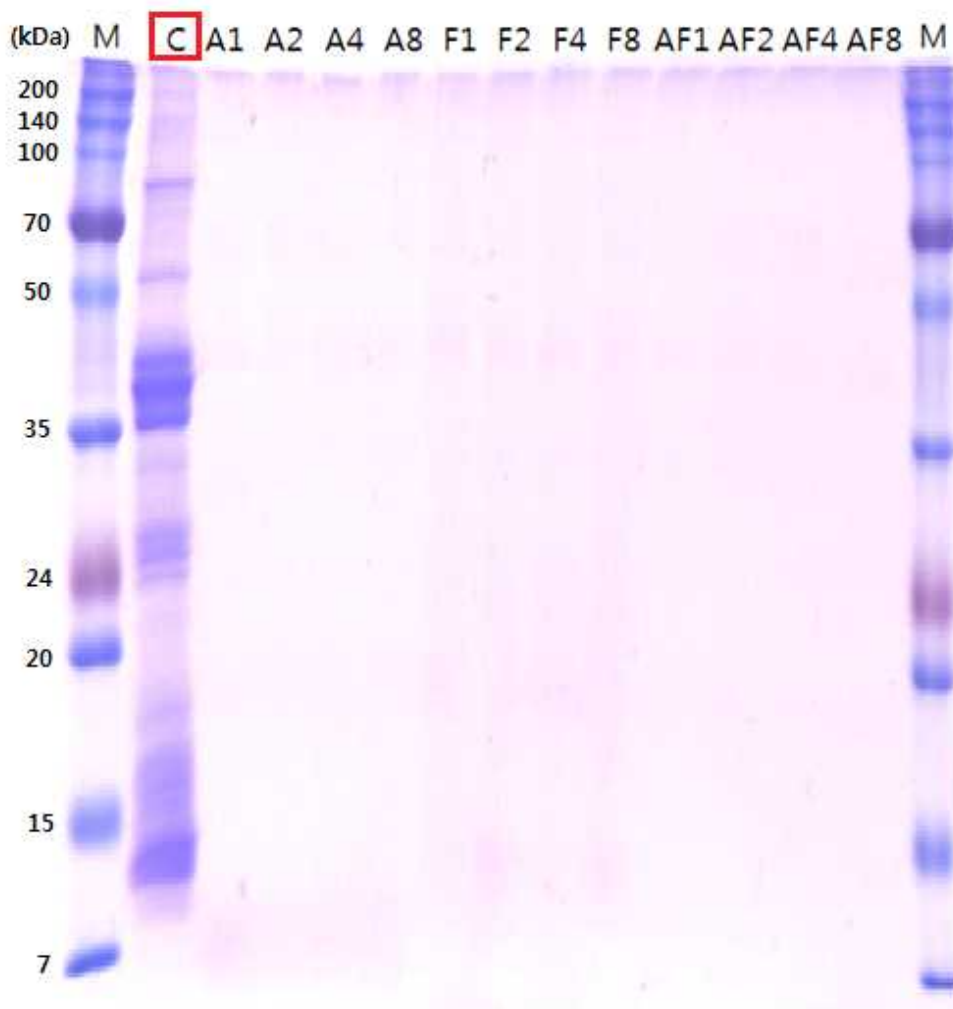


Fig. 2-6. SDS-PAGE of *Tenebrio molitor* hydrolysates

M: Marker; C: control; A: Alcalase processing; F: Flavourzyme processing;
 AF: pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with
 Flavourzyme for the remainder of the hours;
 1, 2, 4, 8: processing time(hours)

2.5. DPPH, ABTS 자유 라디칼 소거 활성능 및 FRAP 활성

갈색거저리 가수분해물을 제조하는 데 있어 수율은 C보다 효소 처리군에서 모두 높게 나타났다(Table 2-3). 따라서 Huang 등(2014)의 방법을 변형하여 수율을 고려한 항산화 활성의 차이를 나타내기 위해 가수분해물 동결건조분의 전체 함량을 곱한 총 항산화 활성을 제시하였다. 수율을 고려한 항산화 활성은 C보다 효소 처리군에서 모두 높았으며($p < 0.05$) 각 시간마다 F군보다 A군, AF군의 항산화 활성이 더 높게 나타났다.

Gimenez 등(2009)은 효소 작용에 의해 아미노산 잔기가 노출된 것이 자유 라디칼에 전자를 공여함으로써 환원제 역할을 하여 항산화 활성이 높아진다고 하였다. FRAP 활성은 산화 및 환원 반응에 대한 항산화 활성을 나타냄에 따라 효소 처리군에서 높아졌다. C는 7.94 mg VCEAC/g로 가장 낮았고, A군은 11.28-17.31 mg VCEAC/g로 시간에 따라 증가, F군은 8.28-11.02 mg VCEAC/g로 시간에 따라 증가, AF군은 1시간에 12.67 mg VCEAC/g 이었다가 2시간부터 8시간까지 11.84-12.83 mg VCEAC/g의 범위로 계속 증가하였다.

DPPH 자유 라디칼 소거 활성능 또한 C가 3.99 mg VCEAC/g로 가장 낮았고, A군은 5.81-7.99 mg VCEAC/g로 시간에 따라 증가, F군은 5.01-6.1 mg VCEAC/g로 증가하다가 8시간에 5.87 mg VCEAC/g로 감소, AF군은 1시간에 6.96 mg VCEAC/g으로 가장 높았다가 2시간부터 8시간까지 5.95-6.29 mg VCEAC/g 범위로 나타났다. -OH기가 있는 방향족아미노산(His, Met, Cys, Pro, Ala, Gly) 잔기를 갖는 펩타이드는 DPPH 자유 라디칼 소거능 강화와 관련되어(Cumby 등 2008), 효소 처리에 의한 특정 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드가 DPPH 항산화능을 높였을 것으로 사료된다.

ABTS 자유 라디칼 소거 활성능도 C가 20.07 mg VCEAC/g로 가장 낮았고, A군은 62.19-98.6 mg VCEAC/g로 시간에 따라 증가, F군도 30.77-40.4 mg VCEAC/g로 시간에 따라 증가, AF군은 1시간에 61.46 mg VCEAC/g로 가장 높았다가 2시간부터 8시간까지 57.82-61.44 mg

VCEAC/g 범위로 나타났다. Saito 등(2003)은 C-말단에 tryptophan 혹은 tyrosine이 있는 tripeptide가 강한 ABTS 라디칼 소거능을 갖는다고 하였으며, 항산화 펩타이드로 알려진 것에는 Val, Leu과 같은 소수성 아미노산 잔기가 N-말단에 위치한 펩타이드 혹은 Pro, His, Tyr의 특정 아미노산 배열을 가진 펩타이드 등이 있다(Chen HM 등 1996). Alcalase는 endopeptidase로서 폴리펩타이드 배열의 안쪽 펩타이드 결합을 무작위로 절단하여 tripeptide 및 소수성 잔기를 가진 펩타이드를 생성할 수 있으므로(Thiansilakul 등 2006) A군에서 항산화능을 크게 높였을 것으로 사료된다.

Table 2-3. DPPH, ABTS, FRAP antioxidant capacities of *Tenebrio molitor* hydrolysates

Type ²⁾	VCE ³⁾ (mg/g total dried weight)		
	DPPH	ABTS	FRAP
C	3.99±0.22 ^{g,1)}	20.07±1.28 ^g	7.94±0.26 ^h
A1	5.81±0.28 ^{ef}	62.19±2.17 ^d	11.28±0.50 ^{def}
A2	6.82±0.43 ^{bcd}	72.32±1.16 ^c	13.35±0.51 ^c
A4	7.58±0.44 ^{ab}	84.42±5.90 ^b	15.73±0.96 ^b
A8	7.99±0.16 ^a	98.60±2.55 ^a	17.31±0.83 ^a
F1	5.01±0.31 ^f	30.77±1.12 ^f	8.28±0.40 ^h
F2	5.80±0.09 ^{ef}	34.76±0.57 ^{ef}	9.29±0.56 ^{gh}
F4	6.10±1.05 ^{cde}	39.30±6.13 ^e	10.39±1.48 ^{fg}
F8	5.87±0.26 ^{def}	40.40±0.84 ^e	11.02±0.70 ^{ef}
AF1	6.96±0.26 ^{bc}	61.46±0.95 ^d	12.67±0.45 ^{cd}
AF2	5.95±0.29 ^{de}	58.37±5.14 ^d	11.84±0.81 ^{cde}
AF4	6.56±1.16 ^{cde}	57.82±8.90 ^d	12.20±1.80 ^{cde}
AF8	6.29±0.17 ^{cde}	61.44±1.19 ^d	12.83±0.45 ^{cd}

¹⁾Values are means±SD (n=3). Values of different superscript letters in each column are significantly different(p<0.05).

²⁾C: control; A: Alcalase processing; F: Flavourzyme processing; AF: pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for the remainder of the hours;

1, 2, 4, 8: processing time(hours)

³⁾VCE: Vitamin C equivalent antioxidant activity

2.6. 관능적 특성 및 유리 아미노산 분석

2.6.1 관능적 특성 평가

단백질분해효소 처리를 달리하여 제조한 갈색거저리 가수분해물의 관능적 특성 결과를 Table 2-4에 나타내었다.

색의 기호도에서 AF군이 전체적으로 높게 나타났고 AF2를 제외하면 모든 시료에서 기호도가 4점(보통이다) 미만으로 나타났다. 색차계를 이용하여 L값, a값, b값을 측정한 결과 특히 AF2의 명도가 86.35로 가장 높았고 b값은 18.67로 가장 낮아(data not shown), 밝고 진하지 않은 색상이 색의 기호도에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다. 향의 기호도는 A군에서 A1, A2, A4가 4점 이상으로 가장 높았으나 A8에서 3.5로 낮아졌고 나머지 시료들에서도 기호도가 4점 미만으로 나타났으나 유의성은 발견되지 않았다. 가수분해물에서 느껴지는 맛의 강도의 경우, 대조군에서 낮았던 반면 효소 처리군에서는 모두 높아졌다. 효소 처리군에서는 모두 4점 이상인 것으로 나타났으며 각 효소 처리군마다 시간이 증가함에 따라 느껴지는 맛의 강도 또한 높아졌다.

이를 기호도와 연관시켜 보았을 때, 강도가 높게 나타난 A군, AF군에서는 기호도가 모두 3점(약간 싫다) 이하인 것으로 나타났고, 패널들은 맛의 강도가 낮은 대조군(C)에서 기호도를 높게 표시하거나 F군에 기호도를 높게 표시하였다($p < 0.05$). 이를 통해 Flavourzyme에 의해 특정한 맛이 느껴지는 것이 선호되며 효소 처리별로 느껴지는 가수분해물의 맛이 기호도에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. Suh 등(2003)에서와 마찬가지로 풍미 증진 목적의 상업용 효소 Flavourzyme을 활용한 가수분해물의 조미소재 이용가능성을 확인할 수는 있었으나, 모든 시료에서 기호도가 '보통' 이하로 나타났으므로 활용성을 높이기 위해서는 부재료의 첨가를 통한 관능적 측면의 보완 등이 필요할 것으로 판단된다.

Table 2-4. Sensory evaluation of *Tenebrio molitor* hydrolysates

Type	Color acceptance	Aroma acceptance	Taste intensity	Overall acceptance
C	3.28±1.22 ^{bc}	3.72±1.30 ^{abcd}	3.66±1.60 ^b	3.56±1.54 ^{ab}
A1	3.50±1.14 ^{bc}	4.09±1.12 ^{abc}	4.03±2.15 ^{ab}	2.69±1.35 ^{cd}
A2	3.38±1.13 ^{bc}	4.19±1.03 ^{ab}	4.19±2.01 ^{ab}	2.81±1.26 ^{bcd}
A4	3.38±1.34 ^{bc}	4.25±1.05 ^a	4.44±2.14 ^{ab}	2.63±1.26 ^{cd}
A8	3.28±1.59 ^{bc}	3.50±1.19 ^{bcd}	5.00±2.17 ^a	2.19±1.09 ^d
F1	3.06±1.52 ^c	3.38±1.24 ^d	4.34±1.64 ^{ab}	3.72±1.51 ^a
F2	3.09±1.25 ^c	3.66±1.18 ^{abcd}	4.47±1.63 ^{ab}	3.81±1.51 ^a
F4	3.38±1.50 ^{bc}	3.56±1.05 ^{abcd}	4.63±1.77 ^{ab}	3.34±1.58 ^{abc}
F8	3.75±1.05 ^{bc}	3.59±1.10 ^{abcd}	4.69±1.53 ^{ab}	3.38±1.29 ^{abc}
AF1	3.66±1.21 ^{bc}	3.47±1.44 ^{cd}	4.56±1.97 ^{ab}	2.81±1.62 ^{bcd}
AF2	4.47±1.16 ^a	3.91±1.12 ^{abcd}	4.38±2.09 ^{ab}	2.91±1.42 ^{bcd}
AF4	3.59±1.48 ^{bc}	3.66±1.45 ^{abcd}	4.81±2.07 ^a	2.34±1.52 ^d
AF8	3.91±1.35 ^{ab}	3.47±1.37 ^{cd}	5.00±2.21 ^a	2.75±1.87 ^{bcd}

Values are mean±SD (n=32). Values of different letters in each column are significantly different at p<0.05.

2.6.2 유리 아미노산 분석 및 기호도와의 상관성

대조군(C)과 함께 각 효소 처리군(A군, F군, AF군)에서 기호도가 가장 높았던 시료를 하나씩 선정하여 총 4가지 시료(C, A2, F2, AF2)의 유리 아미노산 조성 및 함량을 Table 2-5로 나타냈고, 가수분해물의 기호도와 유리 아미노산 간의 상관성을 함께 분석하였다.

관능 평가 기호도 결과는 $F2 > C > AF2 > A2$ 순서로, 유리 아미노산과 기호도 간의 상관관계를 분석한 결과 Glu, Gln과 Pro, His에서 유의한 정의 상관관계를 보였다. Glu, Gln은 감칠맛을, Pro, His은 단맛이나 무미를 내는 것으로 알려져 있다(Nishimura와 Kato 1988). 또한 유황맛(sulfurous taste)을 내는 아미노산인 Met은(Toko 2000) 유의성은 없었으나 음의 상관관계를 나타내 기호도가 가장 높았던 F2의 아미노산 조성이 맛에 끼치는 역할을 파악할 수 있었다. 하지만 이와 함께 taste-active component로 역할을 하는 Tau, GABA(Fuke 등 1991, Brotons 등 2004, Obata 등 1997)에서 유의한 정의 상관관계를 나타내면서 쓴맛을 내는 것으로 알려진 Trp(Solms 1969)에서도 유의한 정의 상관성을 보여, 모든 시료의 기호도가 4점(보통이다) 이하로 나타난 이유가 이러한 아미노산 조성의 영향과도 관련이 있을 것이라 판단된다.

효소 처리는 효소의 종류에 따라 아미노산의 생성과 아미노산 배열이 다른 펩타이드의 생성에 영향을 주고(Kristinsson 등 2000), 각각의 유리 아미노산은 음식의 단맛, 쓴맛, 신맛, 감칠맛(우마미)에 영향을 주는 것으로 알려져 있어 효소 처리를 달리한 가수분해물의 기호도는 달라질 수 있다. Ney 등(1971)은 펩타이드에서 느껴지는 쓴맛은 소수성 아미노산이 side chain을 구성하는 데에서 비롯된다고 하였고, Yamasaki(1987)는 총 질소 함량 대비 유리 아미노산의 함량이 적어 질소 화합물의 구성 대부분이 peptide이며 natto의 쓴맛은 이러한 펩타이드에 의한 것이라 밝혀, 본 연구에서 유리 아미노산 함량이 가장 낮은 A군의 기호도가 낮았던 것도 쓴맛 펩타이드의 증가와 연관시켜 볼 수 있을 것이다. 한편, Flavourzyme을 첨가하였으나 Alcalase의 첨가 또한 동반했던 AF군은

아미노산의 배열에 따라 peptide의 조성이 달라지면서 맛에 영향을 끼칠 수 있다. 두 효소의 복합적인 작용에 의해 아미노산 배열에 따른 쓴맛 펩타이드가 생성되거나 쓴맛 아미노산(Val, Met, Phe, Ile, Leu)의 증가 (Table 2-5)가 나타난 것이 기호도를 감소시켰을 것으로 판단된다.

본 연구의 가수분해물에서는 Pro의 함량이 아미노산 중 가장 높았는데, 이는 갈색거저리 유충 중장에 함유되어 있는 prolyl carboxypeptidase에 의해 proline 잔기가 분해됨에 따른 결과로 사료된다(Goptar 등 2013). Proline은 기호도와 유의한 정의 상관관계를 나타내기도 하였으며 ($p<0.05$), 단맛을 내는 아미노산으로 알려져 Pro의 함량 증가가 기호도에도 긍정적인 영향을 끼쳤을 것으로 본다.

Table 2-5. Free amino acids analysis and Pearson correlation coefficients with overall acceptance scores of *Tenebrio molitor* hydrolysates

Free Amino acids	Type ³⁾				Correlation coefficients ²⁾
	C	A2	F2	AF2	
	(unit: mg/100g, dry basis)				
Asp	136.43±3.13 ^{b,1)}	67.29±0.84 ^c	402.10±15.85 ^a	429.99±28.05 ^a	0.253
Glu	800.09±2.64 ^c	462.87±3.16 ^d	1136.61±51.86 ^a	936.81±43.98 ^b	0.687 [*]
Asn	49.70±1.21 ^d	84.74±2.33 ^c	621.83±22.62 ^b	804.92±4.41 ^a	0.031
Ser	258.34±2.89 ^c	185.68±3.05 ^d	963.11±36.79 ^b	1070.32±5.59 ^a	0.174
Gln	1297.46±8.08 ^c	687.17±7.07 ^d	1898.20±165.06 ^a	1612.97±18.33 ^b	0.637 [*]
His	1205.81±25.31 ^b	617.82±27.37 ^c	1290.78±36.48 ^a	1220.82±41.55 ^b	0.677 [*]
Gly	202.65±1.71 ^c	98.36±2.81 ^d	435.80±18.67 ^b	477.82±15.10 ^a	0.275
Thr	309.04±19.72 ^c	202.75±2.73 ^d	904.92±33.92 ^b	1049.42±27.82 ^a	0.163
Arg	1435.04±19.99 ^b	803.59±16.71 ^c	2179.17±79.13 ^a	2161.25±269.87 ^a	0.443
Ala	724.00±2.89 ^b	438.68±1.40 ^c	1442.99±78.73 ^a	1381.92±167.03 ^a	0.385
Tau	139.07±2.02 ^a	72.85±1.78 ^c	97.89±7.02 ^b	68.36±5.01 ^c	0.712 ^{**}
GABA	36.80±3.95 ^a	18.58±4.54 ^c	26.66±2.64 ^b	21.85±3.65 ^{bc}	0.658 [*]

Tyr	2448.30±90.50 ^b	1319.86±25.04 ^c	3504.88±535.81 ^a	3442.66±279.03 ^a	0.466
Val	736.61±1.99 ^c	385.75±6.88 ^d	1377.48±64.24 ^b	1528.68±51.67 ^a	0.278
Met	17.25±0.41 ^d	81.06±2.62 ^c	223.05±16.48 ^b	350.46±6.29 ^a	-0.181
Trp	447.31±22.53 ^b	204.81±5.72 ^c	527.85±44.71 ^a	429.57±38.40 ^b	0.779 ^{**}
Phe	322.76±3.69 ^c	296.55±3.15 ^c	985.86±31.75 ^b	1158.06±5.70 ^a	0.100
Ile	344.28±2.46 ^c	184.78±3.63 ^d	915.37±35.06 ^b	982.91±5.03 ^a	0.253
Leu	468.23±19.06 ^c	481.81±9.54 ^c	1970.40±85.82 ^b	2237.74±41.92 ^a	0.115
Lys	574.24±11.38 ^c	341.45±11.59 ^d	1768.66±56.41 ^b	2023.37±56.38 ^a	0.181
Pro	5252.72±100.90 ^a	2184.58±72.77 ^c	3414.61±334.76 ^b	2323.00±187.82 ^c	0.712 ^{**}
Total	17201.85±1174.84	9217.68±507.00	26110.67±961.69	25957.01±866.94	

¹)Means with different letters within a same row are significantly different at p<0.05

²)Pearson correlation coefficients between the free amino acids and overall acceptance scores

*significant(p<0.05) **significant(p<0.01)

³)C: Control. non-processing with any proteases for 1 hour

A2: processing with Alcalase for 2 hours

F2: processing with Flavourzyme for 2 hours

AF2: pre-processing with Alcalase for 0.5 hour and post-processing with Flavourzyme for 1.5 hours

IV. 요약 및 결론

1. 갈색거저리 유충의 새로운 조리 및 가공 적용성을 검토하기 위해 황국균(*Aspergillus oryzae*)을 이용한 발효액을 제조하였다. Protease 역가가 높은 갈색거저리 코지를 제조(황국균 1% 농도, 48시간 배양)한 후 소금물 담금 처리를 달리하여 90일 동안 숙성한 발효액의 변화 양상을 관찰한 결과, L군은 염도가 낮아 발효액의 효소활성을 증가시키며 단백질 및 탄수화물 분해산물을 많이 생성하였다. 특히 갈색거저리 열풍건조 분 함량이 많은 LX군에서 protease 활성도의 증가로 총 질소 및 아미노 질소 함량이 숙성 기간 중 가장 높았다($p<0.05$).

90일 동안 숙성한 LX의 유리 아미노산 함량이 2426.92 mg/100g으로 가장 높았으며($p<0.05$) 이 중 감칠맛에 영향을 주는 Glutamic acid가 15.16%를 차지하였고, 7점 척도의 관능검사 결과 단맛 (3.53점), 구수한 맛 (4.30점), 전체기호도 (4.90점)에서 모두 높은 점수를 얻었다($p<0.05$). 쌀가루를 첨가한 O군에서는 숙성함에 따라 amylase 활성도가 높아져 총 당 및 환원당이 증가하였으나, 관능적 측면에서 쌀가루 첨가 유무보다는 소금 농도가 낮은 L군에서 더 좋은 효과를 나타냈다($p<0.05$).

모든 실험군에서 산도는 1% 미만이며 대장균군은 불검출로 나타나 식용하기에 어려움이 없었던 것으로 보이며, 그 중 LX는 관능 기호도가 우수했던 것과 함께 아미노산과 환원당과의 갈색 반응을 통한 갈색도 증가와 향의 강도 증가를 보였다.

2. 황국균 유래 단백질분해효소 Flavourzyme을 이용한 조미소재로의 이용가능성을 탐색하는 데 있어 Alcalase와 Flavourzyme을 단독 처리 혹은 복합 처리하여 가수분해물을 제조하였다. 효소 처리군은 대조군보다 모두 수율이 높았으며, 효소 처리군의 가수분해도는 F군과 AF군이 높았고 AF군은 시간에 증가함에 따라 가수분해도가 크게 증가했다. SEC 결과, 효소 처리군에서는 고분자의 단백질이 저분자의 펩타이드로 분해됨을 확인하였고 AF에서 peak4-peak7의 면적 값이 가장 높게 나타났다.

실험군의 수율을 고려한 총 항산화활성은 DPPH 자유 라디칼 소거능, ABTS 자유 라디칼 소거능($p<0.05$), FRAP 활성능($p<0.05$)에 있어 C가 가장 낮았고 A군>AF군>F군 순서로 높았다.

관능 평가 결과, 맛의 강도가 낮은 대조군(C)과 맛의 강도가 높은 F군에서 기호도가 모두 높게 나타나 Flavourzyme에 의해 특정한 맛이 느껴지는 것이 선호됨을 알 수 있었고(관능 평가 기호도 결과: F2>C>AF2>A2), 유리 아미노산과 기호도 간의 상관관계 분석 결과 감칠맛을 내는 Glu, Gln과 단맛을 내거나 무미로 알려진 Pro, His에서 유의한 정의 상관관계를, 유황맛(sulfurous taste)을 내는 Met에서 유의성은 없었으나 음의 상관관계를 나타내 조미소재 활용에 있어 F2가 좋은 소재임을 확인하였다. 그러나 관능 기호도는 모두 4점(보통이다) 이하로 나타나 항산화능을 고려한다면 A2, AF2 또한 기능성 조미소재가 될 수 있으며, 가수분해물의 활용성을 높이기 위해서는 부재료의 첨가를 통한 관능적 측면의 보완 등이 필요할 것으로 판단된다.

본 연구는 갈색거저리 유충을 원료로 하여 황국균으로 코지를 만들고 이를 장기 숙성한 천연 조미료를 개발하기 위해 적합한 발효액 조건을 확립함으로써 추후 간장 형태의 액상 조미료 개발에 있어 기초 연구 자료로 활용될 수 있을 것이다. 또한 Alcalase와 Flavourzyme을 단독 혹은 복합 처리함으로써 갈색거저리 유충 탈지분이라는 새로운 기질의 분해산물 생성 패턴을 파악하고, 항산화 활성과 관능적 특성을 파악하여 천연 조미소재로의 활용 가능성을 탐색하는 데에 의의가 있다. 가수분해물 액상 조미소재 F2의 경우 1 mL당 3.39 mg의 총 유리 아미노산을, 발효액 액상 조미소재 LX(90)의 경우 1 mL당 24.27 mg의 총 유리 아미노산을 함유하며 관능적 기호도 비교 결과 LX(90)은 5점(약간 좋다)에 가까운 기호도로 F2의 점수보다 높아, 단백질 분해산물을 이용한 조미소재 개발에 있어 황국균을 이용한 숙성 발효액의 형태가 조미소재로서 활용도가 높을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*: Elsevier Applied Science Publishers.
- AOAC. (1990). Methods of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Virginia USA: Association of Official Analytical Chemists: Inc.
- Applebaum, S. W., Birk, Y., Harpaz, I., & Bondi, A. (1964). Comparative studies on proteolytic enzymes of *Tenebrio molitor* L. *Comparative biochemistry and physiology*, 11(1), 85-103.
- Bae, M. S., & Lee, S. C. (2008). Preparation and characteristics of kimchi with added *Styela clava*. *Korean journal of food and cookery science*, 24(5), 573-579.
- Bagnasco, L., Pappalardo, V. M., Meregaglia, A., Kaewmanee, T., Ubiali, D., Speranza, G., & Cosulich, M. E. (2013). Use of food-grade proteases to recover umami protein - peptide mixtures from rice middlings. *Food research international*, 50(1), 420-427.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Boudreau, J. C. (1980). Taste and the taste of foods. *Naturwissenschaften*, 67(1), 14-20.
- Brand Williams, W., Cuvelier, ME., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brotons Martinez, J., Chatzifotis, S., Divanach, P., & Takeuchi, T. (2004). Effect of dietary taurine supplementation on growth

- performance and feed selection of sea bass *Dicentrarchus labrax* fry fed with demand feeders. *Fisheries Science*, 70(1), 74-79.
- Byun, M. W., Nam, T. G., & Lee, G. H. (2015). Physicochemical and Sensory Characteristics of Doenjang Made with Various Concentrations of Salt Solution. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(10), 1525-1530.
- Chae, H. J., In, M., & Kim, M. H. (1997). Production and characteristics of enzymatically hydrolyzed soy sauce by the treatment using proteases. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition (Korea Republic)*. 26(5), 784-787.
- Chang, C. Y., Wu, K. C., & Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537-1543.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623.
- Cheung, I. W., & Li Chan, E. C. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. *Food Chemistry*, 122(4), 1003-1012.
- Cho, K. M., Kang, J. R., Kim, G. M., Kang, M. J., Hwang, C. E., Jeong, Y. S., & Shin, J. H. (2014). Quality characteristics of low salted garlic Doenjang during fermentation. *Korean Journal of Food Preservation*, 21(5), 627-635.
- Choi, H. S., Kim, J. H., & Kim, J. C. (2007). Effects of different

- drying methods on fatty acids, free amino acids, and browning of dried *Alaska pollack*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 36(9), 1182–1187.
- Choi, K. S., Choi, J. D., Chung, H. C., Kwon, K. I., Im, M. H., Kim, Y. H., & Kim, W. S. (2000). Effects of mashing proportion of soybean to salt brine on Kanjang (soy sauce) quality. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32(1), 174–180.
- Choi, K. S., Kwon, K., Lee, J., Lee, R., Choi, J., Ryu, M., & An, Y. (2003). Effects of Methods of Adding Barley Malt in the Production of Kanjang (Korean traditional soy sauce) on it's Chemical Compositions and Sensory Characteristics. *Journal of the Korean society of Agricultural and biotechnology*.
- Choi, N. S., Chung, S. J., Choi, J. Y., Kim, H. W., & Cho, J. J. (2013). Physico-chemical and sensory properties of commercial Korean traditional soy sauce of mass-produced vs. small scale farm produced in the Gyeonggi area. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 26(3), 553–564.
- Choi, Y. H., Lee, J. E., Kim, E. M., & Park, S. Y. (2012). Quality changes of steamed rice bread with addition of active gluten and rice nuruk. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 25(2), 253–258.
- Chung, M. Y., Kwon, E. Y., Hwang, J. S., Goo, T. W., & Yun, E. Y. (2013). Pre-treatment conditions on the powder of *Tenebrio molitor* for using as a novel food ingredient. *Journal of Sericultural and Entomological Science*, 51(1), 9–14.
- Chung, M. Y., Lee, J. Y., Lee, J. C., Park, K. S., Jeong, J. P., Hwang, J. S., & Yun, E. Y. (2014). Establishment of self-specification and shelf-life by standardization of manufacturing process for lyophilized *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Sericultural and*

- Entomological Science*, 52(1), 73–78.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109(1), 144–148.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350–356.
- Fujimaki, M. (1974). Flavor-improving effects of glutamic acid and inosine monophosphate *Natürliche und Synthetische Zusatzstoffe in der Nahrung des Menschen* (pp. 102–116): Springer.
- Fuke, S., & Konosu, S. (1991). Taste-active components in some foods: a review of Japanese research. *Physiology & Behavior*, 49(5), 863–868.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez Guillén, M. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976–983.
- Goptar, I. A., Shagin, D. A., Shagina, I. A., Mudrik, E. S., Smirnova, Y. A., Zhuzhikov, D. P., & Filippova, I. Y. (2013). A digestive prolyl carboxypeptidase in *Tenebrio molitor* larvae. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(6), 501–509.
- Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19, 489–498.
- Hamada, J. (2000). Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *Journal of Food Science*, 65(2), 305–310.
- Hamilton, L. F., Simpson, S. G., & Talbot, H. P. (1964). Quantitative

chemical analysis.

- Huang, Y., So, Y. J., Hwang, J. R., Yoo, K. M., Lee, K. W., Lee, Y. J., & Hwang, I. K. (2014). Comparative studies on phytochemicals and bioactive activities in 24 new varieties of red pepper. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 46(4), 395–403.
- Jamdar, S., Rajalakshmi, V., Pednekar, M., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184.
- Jeon, M. S., Sohn, K. H., Chae, S. H., Park, H. K., & Jeon, H. J. (2002). Color characteristics of Korean traditional soy sauces prepared under different processing conditions. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31(1), 32–38.
- Jin, T. Y., Lee, W. G., Lee, I. S., & Wang, M. H. (2008). Changes of physicochemical, sensory and antioxidant activity characteristics in rice wine, Yakju added with different ratios of *Codonopsis lanceolata*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 40(2), 201–206.
- Jones, L., Cooper, R., & Harding, R. (1972). Composition of mealworm *Tenebrio molitor* larvae. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 3(4), 34–41.
- Kang, J. E., Choi, H. S., Choi, H. S., Park, S. Y., Song, J., Choi, J. H., & Jung, S. T. (2013). The quality characteristics of commercial deonjang certified for traditional foods. *The Korean Journal of Community Living Science*, 24(4), 537–542.
- Kang, S. H., Lee, S., Ko, J. M., & Hwang, I. K. (2011). Comparisons of the physicochemical characteristics of Korean traditional soy

- sauce with varying soybean seeding periods and regions of production. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 24(4), 761-769.
- Ketelaere, A.d., Demeyer, D., Vandekerckhove, P., & Vervaeke, P. (1974). Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. *Journal of Food Science*, 39(2), 297-300.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Kim, E. Y., & Rhyu, M. R. (2000). The chemical properties of Doenjang prepared by *Monascus koji*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32(5), 1114-1121.
- Kim, H. J., & Yang, E. J. (2015). Optimization of Hot Water Extraction Conditions of Wando Sea Tangle (*Laminaria japonica*) for Development of Natural Salt Enhancer. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(5), 767-774.
- Kim, H. S., & Kim, Z. U. (1986). A Study on the Manufacturing of Soysauce by the Use of Milled Barely. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 29(2), 107-115.
- Kim, H. S., Park, I. B., Lee, Y. J., Shin, G. W., Lim, J. Y., Park, J. W., & Jo, Y. C. (2010). Characteristic of Glasswort (*Salicornia Herbacea L.*) Mixture Fermentation Utilizing *Aspergillus oryzae*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39(9), 1384-1390.
- Kim, J. (2004). Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste-amino nitrogen, amino acids, and color. *Journal of Food Hygiene and*

Safety.

- Kim, J. H., Yoo, J. S., Lee, C. H., Kim, S. Y., & Lee, S. K. (2006). Quality properties of soybean pastes made from meju with mold producing protease isolated from traditional meju. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 49(1), 7-14.
- Kim, N. (2007). Trend of research papers on soy sauce tastes in Japan. *Food Industry and Nutrition*, 12(1), 40-50.
- Kim, S. Y., Son, Y. J., Kim, S. H., Kim, A. N., Lee, G. Y., & Hwang, I.K. (2015). Studies on oxidative stability of *Tenebrio molitor* larvae during cold storage. *Korean journal of food and cookery science*, 31(1), 62-71.
- Kim, Y. M., Koo, J. G., Lee, Y. C., & Kim, D. S. (1990). Study on the use of sardine meal koji and autolysates from sardine meat in rapid processing of sardine sauce. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(2), 167-177.
- Kim, Y. S., Yeum, D. M., Roh, S. B., Kim, Y. H., & Chung, S. K. (2008). Quality characteristics of soybean anchovy sauce added with medicinal herbs. *Korean Journal of Food Preservation*, 15(3), 367-376.
- Ko, S., Choi, K., & Kim, H. (1996). Comparison of proximate composition, mineral nutrient, amino acid and free sugar contents of several *Panax* species. *Korean Journal of Ginseng Science (Korea Republic)*.
- Kong, B., & Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 6059-6068.
- Korea Food and Drug Administration(2016). Quantitation of total

- aerobic plate and E coli/coliform. Available from:
<http://www.kfda.go.kr>. Accessed Dec. 08
- Korea Food and Drug Administration(2016). Quantitation of protease and α -amylase activity in enzyme food. Available from:
<http://www.kfda.go.kr>. Accessed Dec. 08
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1), 43-81.
- Kwon, O. J., Kim, M., Kim, T. W., Kim, D. G., Son, D. H., Choi, U. K., & Lee, S. H. (2010). Changes in the quality characteristics of soy sauce made with salts obtained from deep ocean water. *Korean Journal of Food Preservation*, 17(6), 820-825.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Lee, E. Y., & Park, G. S. (2009). Quality characteristics of Kochujang with addition of apple juices. *Korean journal of food and cookery science*, 25(6), 747-757.
- Lee, J., & Mok, C. (2010). Changes in physicochemical properties of low salt soybean paste (Doenjang) during fermentation. *Food Engineering Progress*.
- Lee, K. H., Choi, H. S., Choi, Y. H., Park, S. Y., & Song, J. (2014). Changes in isoflavone content and quality characteristics of Cheonggukjang prepared with *Bacillus subtilis* HJ18-3 and KACC 15935. *Korean Journal of Food Preservation*, 21(1), 121-128.
- Lee, K. H., Song, B. K., Jeong, I. H., Hong, B. I., Jung, B. C., & Lee, D. H. (1997). Processing condition of seasoning material of the mixture of Laminaria and enzyme-treated mackerel meat.

- Korean Journal of Food Science and Technology*, 29(1), 77-81.
- Lee, K. S., & Kim, D. H. (1985). Trial Manufacture of Low-Salted Kochuzang (Red Pepper Soybean Paste) by the Addition of Alcohol. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 17(3), 146-154.
- Lee, S., Jeong, Y., Yim, S. B., & Yu, S. (2015). Antioxidant Activity of Korean Traditional Soy Sauce. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(9), 1399-1406.
- Lee, S. Y., Baik, S. H., Ahn, Y. J., Song, J., Kim, J. H., & Choi, H. S. (2013). Quality characteristics of commercial Korean types of fermented soybean sauces in China. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 796-800.
- Lim, J. H., Jeong, J. H., Jeong, M. J., Jeong, I. H., & Kim, B. M. (2015). Effects of preprocessing on quality of fermented red snow crab *chionoecetes japonicus* sauce. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(3), 284-292.
- Lioe, H. N., Wada, K., Aoki, T., & Yasuda, M. (2007). Chemical and sensory characteristics of low molecular weight fractions obtained from three types of Japanese soy sauce (shoyu) - Koikuchi, tamari and shiro shoyu. *Food Chemistry*, 100(4), 1669-1677.
- Liu, B. Y., Zhu, K. X., Peng, W., Guo, X. N., & Zhou, H. M. (2016). Effect of sequential hydrolysis with endo- and exo-peptidase on bitterness properties of wheat gluten hydrolysates. *RSC Advances*, 6(33), 27659-27668.
- Liu, P., Huang, M., Song, S., Hayat, K., Zhang, X., Xia, S., & Jia, C. (2012). Sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. *Food and Bioprocess*

- Technology*, 5(5), 1775–1789.
- Luh, B. (1995). Industrial production of soy sauce. *Journal of industrial Microbiology*, 14(6), 467–471.
- Mannheim, A., & Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(12), 1163–1169.
- Marcuse, R. (1962). The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 39(2), 97–103.
- McCarthy, A. L., O’Callaghan, Y. C., & O’Brien, N. M. (2013). Protein hydrolysates from agricultural crops – bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture*, 3(1), 112–130.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mok, C. K., Lee, J. Y., Song, K. T., Kim, S. Y., Lim, S. B., & Woo, G. J. (2000). Changes in physicochemical properties of salted and fermented shrimp at different salt levels. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32(1), 187–191.
- Ney, K. (1971). Prediction of bitterness of peptides from their amino acid composition. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung*, 147(2), 64–&.
- Ng, W. K., Liew, F. L., Ang, L. P., & Wong, K. W. (2001). Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research*, 32(s1), 273–280.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble

- concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70(4), 571–578.
- Nishimura, T., & Kato, H. (1988). Taste of free amino acids and peptides. *Food reviews international*, 4(2), 175–194.
- Noh, K. H., Min, K. H., Seo, B. Y., Kim, S. H., Seo, Y. W., & Song, Y.S. (2012). Characteristics of protein from red crab (*Chionoecetes japonicus*) shell by commercial proteases. *Korean Journal of Nutrition*, 45(5), 429–436.
- Obata, H., Shimada, K., Sakai, N., & Saito, N. (1997). GABAergic neurotransmission in rat taste buds: immunocytochemical study for GABA and GABA transporter subtypes. *Molecular brain research*, 49(1), 29–36.
- Oh, H. I., & Eom, S. M. (2008). Changes in microflora and enzyme activities of cheonggukjang prepared with germinated soybeans during fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 40(1), 56–62.
- Oh, H. I., & Park, J. M. (1997). Changes in microflora and enzyme activities of traditional kochujang prepared with a meju of different fermentation period during aging. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 29(6), 1158–1165.
- Oh, J. H., Koo, M. O., Lee, K. E., & Lee, S. C. (2002). Preparation of Whelk Internal Organ Jeotgal with the Addition of Commercial Proteolytic Enzymes. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 34(4), 570–576.
- Oh, S. C. (2013). Influences of Squid Ink Added to Low Salt Fermented Squid on Its Changes in Lactic Acid Bacteria. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 26(4), 678–684.
- Oliva, A., Llabrés, M. a., & Fariña, J. B. (2001). Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography

- and laser-light scattering. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 25(5), 833-841.
- Park, H. K., & Sohn, K. H. (1997). Analysis of significant factor in the flavor of traditional Korean soy sauce (II)-analysis of nitrogen compounds, free amino acids and nucleotides and their related compounds. *Journal of the Korean Society of Food Culture*, 12(1), 63-69.
- Park, I. B., Park, J. W., Kim, J. M., Jung, S. T., & Kang, S. G. (2005). Quality of soybean paste (Doenjang) prepared with lotus root powder. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 34(4), 519-523.
- Park, S. Y., Lim, J. M., Choi, Y. H., Choi, H. S., Kim, J. H., Kim, E. J., & Jang, Y. J. (2015). Quality and sensory characteristics of soy sauces containing *Astragalus membranaceus* by aging period. *Korean Journal of Food Preservation*, 22(5), 636-643.
- Park, W. P., Kim, N. D., Lee, S. C., Kim, S. Y., & Cho, S. H. (2006). Effects of powder and concentrates of *Prunus mume* on the quality of doenjang during fermentation. *Korean Journal of Food Preservation*, 13(5), 574-580.
- Qin, L., & Ding, X. (2007). Formation of taste and odor compounds during preparation of Douchiba, a chinese traditional soy fermented appetizer. *Journal of food biochemistry*, 31(2), 230-251.
- Roberts, P. E., & Willis, J. H. (1980). The cuticular proteins of *Tenebrio molitor*: I. Electrophoretic banding patterns during postembryonic development. *Developmental biology*, 75(1), 59-69.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties

- of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668–3674.
- Sanatan, P. T., Lomate, P. R., Giri, A. P., & Hivrale, V. K. (2013). Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta americana*. *BMC biochemistry*, 14(1), 1.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689–2694.
- Seo, W., Lee, H., & Baek, H. (2008). Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. *Journal of food science*, 73(1), S41–S46.
- Seok, Y. R., Kim, Y. H., Kim, S., Woo, H. S., Kim, T. W., Lee, S. H., & Choi, C. (1994). Change of protein and amino acid composition during chungkook-jang fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 37(2), 65–71.
- Shin, J. H., Choi, D. J., Lee, S. J., Cha, J. Y., Kim, J. G., & Sung, N. J. (2008). Changes of physicochemical components and antioxidant activity of garlic during its processing. *Journal of life science*, 18(8), 1123–1131.
- Solms, J. (1969). Taste of amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 686–688.
- Song, Y. C., & Lee, S. P. (2013). Evaluation in physicochemical properties of soy sauce fortified with soymilk residue (okara koji). *Korean Journal of Food Preservation*, 20(6), 818–826.
- Su, G., Cui, C., Zheng, L., Yang, B., Ren, J., & Zhao, M. (2012). Isolation and identification of two novel umami and umami-enhancing peptides from peanut hydrolysate by

- consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS. *Food chemistry*, 135(2), 479-485.
- Suh, H. J., Whang, J., Kim, Y., Bae, S., & Noh, D. (2003). Preparation of angiotensin I converting enzyme inhibitor from corn gluten. *Process Biochemistry*, 38(8), 1239-1244.
- Tang, C. H., Wang, X. S., & Yang, X. Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 114(4), 1484-1490.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 31(2), 266-287.
- Toko, K. (2000). Taste sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 64(1), 205-215.
- Tseng, Y. H., Lee, Y. L., Li, R. C., & Mau, J. L. (2005). Non-volatile flavour components of *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 90(3), 409-415.
- Wallace, J., & Fox, P. (1998). Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food chemistry*, 62(2), 217-224.
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*, 36(9), 949-957.
- Yamasaki, Y. (1987). The bitter taste in natto. *J. Home Econ. Jpn*, 38, 93-97.
- Yang, S. T., & Lee, E. H. (1984). Taste Compounds of Fresh-Water

- Fishes 7. Taste Compounds of Wild Eel Meat. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(1), 33-39.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G., & Kishimura, H. (2015). Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-and two-step hydrolysis. *Journal of food science and technology*, 52(6), 3336-3349.
- Yoo, J., Hwang, J. S., Goo, T. W., & Yun, E. Y. (2013). Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(2), 249-254.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 235-240.

Abstract

A Study on Characteristics of Fermented and Hydrolysed *Tenebrio molitor* Larvae for Liquefied Flavoring Material Application

Ji-Won, Lee

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

This study was conducted as a preliminary research for developing liquid flavoring materials using *A. oryzae* and different proteases on *Tenebrio molitor* larva and for investigating changes in properties of degradation products at different times and methods.

As a result of using *A. oryzae* to produce *T. molitor* koji with the highest protease activity (1% *A. oryzae*, incubated for 48 hours) and maturing for 90 days while varying the salt concentration to observe the changes in the fermented liquid, the protease activity increased in the LX group with low salt concentration and high hot air dried *T. molitor* powder content for the highest total nitrogen and amino-type nitrogen contents during the maturation period ($p < 0.05$). The LX matured for 90 days had 15.16% glutamic acid in the free amino acids and received high scores for sweet taste (3.53 pts), savory taste (4.30 pts), and overall preference (4.90 pts) as a result of sensory test on a scale of 1 to 7. The O group with the addition of rice flour

increased amylase activity with maturation for higher total sugar and reducing sugar. In the sensory aspect, however, the L group with lower salt concentration showed better results than the addition of rice flour ($p < 0.05$). With all experiment groups, acidity was less than 1% and no coliform bacteria was detected, showing edibility. LX, in particular, showed good sensory preference and increase in browning index and aroma intensity by a maillard reaction.

Single or combined treatment with Alcalase(A) and Flavourzyme(F), a protein decomposing enzyme from *A. oryzae*, affected the hydrolysis process. The enzyme-treated groups showed higher yield than the control group and the degree of hydrolysis was higher for the F and AF enzyme-treated groups. The AF group's degree of hydrolysis increased significantly over time. As a result of SEC, high-molecular protein was decomposed into low-molecular peptides in the enzyme-treated groups and the peak4-peak7 area was highest for AF. Total antioxidant activities considering the experiment groups' yield were lowest for C in terms of DPPH free radical removal, ABTS free radical removal ($p < 0.05$), and FRAP activity ($p < 0.05$) and highest for A, followed by AF and F.

As a result of sensory test, preference was high for the control group (C) with low flavor intensity and the F group with high flavor intensity, manifesting that a certain flavor of Flavourzyme was preferred (sensory test preference result: $F2 > C > AF2 > A2$). As a result of analyzing the correlation between free amino acids and preference, there was a significant positive correlation between Glu and Gln (savory taste) and Pro (sweet taste). There was no significant correlation with Met with the sulfurous taste, but there was a negative correlation, showing that F2 is a good flavoring material. However, all sensory preference scores were below 4

(average), so A2 and AF2 could also become functional flavoring materials considering the antioxidant capacity. In order to improve the usability of hydrolyzed materials, the sensory aspect should be supplemented with other additives.

keywords : *Tenebrio molitor* larva, fermentation characteristic, protease, hydrolysis, antioxidant capacities, sensory characteristic

Student Number : 2015-21708